

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
POSGRADO CONJUNTO AGRONOMÍA – VETERINARIA



DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ESPORA DE
Encephalitozoon cuniculi SOBRE EL FENOTIPO DEL MACRÓFAGO
EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN

Por

MVZ. ARGELIA HOLGUÍN SALAS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL

Mayo, 2021

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo con el Cuerpo Académico Consolidado de Zoonosis y Enfermedades Emergentes (UANL-CA-343), Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria, UANL y el Cuerpo Académico Consolidado de Morfología (UANL-CA-230), Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL.

**Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Medicina
Veterinaria y Zootecnia
Campus de Ciencias Agropecuarias Av. Francisco Villa s/n. Col. Ex-Hacienda El
Canadá General Escobedo, N. L. México, C. P. 6605**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA ESPORA DE *Encephalitozoon cuniculi*
SOBRE EL FENOTIPO DEL MACRÓFAGO EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN

Aprobación de tesis por el comité particular de

Argelia Holguín Salas

Dirección de Tesis

PhD Luis Edgar Rodríguez Tovar
Director

Dr. Uziel Castillo Velázquez
Co-Director

Dra. Alicia Magdalena Nevárez Garza
Co-Directora

Dr. Gerardo Méndez Zamora
Co-Director

Dra. Aracely García García
Directora Externa

Dr. Adolfo Soto Domínguez
Director Externo

Dr. Humberto Rodríguez Rocha
Director Externo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis amados padres Manuel y Susana, que jamás han dudado de mi capacidad y me programaron para creer que todo lo puedo lograr.

A mi super esposo Adrián, que con su ejemplo me demuestra que amando tu trabajo y con determinación se llega muy lejos.

A ellos gracias por alargar mis alas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mentor el Dr. Luis Edgar Rodríguez Tovar y a su esposa Dra. Alicia Nevárez Garza, por transmitirme la vibra de investigador y lo que es casarse con un proyecto.

A mis profesores/co-directores Dr. Uziel, Dr. Gerardo, Dr. Adolfo, Dra. Aracely, Dr. Humberto y MC. Cesar, de quienes admiro su entrega y dedicación a la ciencia y porque este trabajo es un reflejo de cada uno de ellos.

Al personal técnico y administrativo de las instituciones en donde se me brindó la oportunidad de trabajar y desarrollar mi proyecto.

Agradezco a mis compañeros de posgrado por tantas experiencias buenas y malas que libramos juntos. A Héctor e Israel que de alguna manera siempre lograron convertir los momentos difíciles en risas.

A mis hermanitos microsporidios Jenny y Jonás, dos jóvenes a quienes admiro muchísimo.

CONTENIDO

.....	iii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	ix
ÍNDICE DE CUADROS.....	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
RESUMEN	xv
ABSTRACT.....	xvii
RESUMEN GRÁFICO.....	xix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación.....	3
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivo General.....	3
1.4. Objetivos Específicos	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1. Antecedentes de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	4
2.2. Características de <i>Encephalitozoon cuniculi</i>	6
2.3. Ciclo de vida e Infección a las células.....	6
2.4. Respuesta inmune	7
2.5. Macrófagos	8
2.6. Activación y polarización del macrófago (M1 y M2)	9
2.6.1. Plasticidad del macrófago	11
2.7. Metabolismo de la Arginina.	11
2.7.1. Vía de iNOS y producción de NO. (Macrófagos M1)	12
2.7.2. Vía de la Arginasa (Macrófagos M2)	14
2.8. Marcadores de macrófagos M1 y M2.....	16
2.9.1. Western blot	18
2.9.2. Citometría de flujo	18
2.9.3. Inmunohistoquímica	19

2.9.4. Métodos para analizar la presencia de Óxido Nítrico para medir indirectamente la presencia de células M1	20
2.9.5. Análisis de Arginasa para medir indirectamente la presencia de células M2 ...	22
2.9. Inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia.....	23
2.10. Reacción de Griess	24
2.11. Ensayo de la actividad de Arginasa.....	26
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1. Animales para experimentación	27
3.1.2. Mantenimiento y Alojamiento	27
3.2. Diseño experimental	27
3.2.1. Tratamiento grupos A y B <i>in vivo</i>	29
3.2.2. Detección de esporas en orina por el método de Calco flúor White	29
3.3. Preparación del inóculo	29
3.3.1. Obtención de esporas	30
3.3.2. Conteo de esporas.....	31
3.3.3. Obtención de las variedades antigénicas de la espora	33
3.4. Cultivo primario a partir de células peritoneales	33
3.4.1. Anestesia y sacrificio.....	33
3.4.2. Lavados peritoneales.....	34
3.4.3. Cultivo de Macrófagos Peritoneales	36
3.5. Estímulos y desafíos <i>in vitro</i>	36
3.5.1. Activación de macrófagos <i>in vitro</i>	36
3.5.2. Infección de macrófagos <i>in vitro</i>	37
3.6. Caracterización de macrófagos M1 y M2	38
3.6.1. Inmunofluorescencia.....	38
3.6.2. Medición de nitritos en sobrenadante	39
3.6.3. Ensayo de medición de actividad de Arginasa	39
3.7. Análisis estadístico	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Obtención de esporas viables	42
4.2. Modelo de infección murino.....	44

4.3. Extracción y cultivo de células peritoneales	46
4.3.1. Identificación de macrófagos	48
4.4. Controles positivos de células M1 y M2	49
4.4.1. Estímulos <i>in vitro</i>	49
4.4.2. Controles positivos grupo A	51
4.4.3. Controles positivos grupo B	51
4.5. Infecciones <i>in vitro</i>	53
4.6. Inmunofluorescencia indirecta	54
4.6.1. Grupo A	54
4.6.2. Grupo B.....	58
4.6.3. Cuantificación de la intensidad de la señal para iNOS y Arg-1.....	62
4.7. Reacción de Griess. Medición de nitritos.....	65
4.8. Ensayo de medición de la actividad de Arg-1.....	66
5. DISCUSIÓN	67
6. CONCLUSIONES.....	73
7. BIBLIOGRAFÍA.....	74

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac	Anticuerpo
Arg-1	Arginasa-1
ASL	Argininosuccinato liasa
ASS	Argininosuccinato sintasa
ATP	Adenosín trifosfato
cAMP	Adenosín monofosfato cíclico
CCL	Ligando de quimiocinas
CD	Cúmulo de diferenciación
DAF	Diamino flurosceína 2
DAMPs	Patrones moleculares asociados a daño celular
DAN	Diamino naftaleno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. cuniculi</i>	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>
EIF	Espora inactivada en formol
EMC	Espora muerta por calor
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EV	Espora viva
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HRP	Peroxidasa de rábano picante
IFA	Inmunofluorescencia
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-1ra	Antagonista del receptor de interleucina 1
IL-23	Interleucina 23
IL-4	Interleucina 4
iNOS	Inductor de óxido nítrico sintasa
kDa	Kilodaltons
LPS	Lipopolisacárido
mAc	Anticuerpos monoclonales
MAMPs	Patrones moleculares asociados a microbios
MFI	Intensidad de fluorescencia media
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
MMR	Receptor de manosa
N ₂ O ₃	Óxido de nitrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NED	N-1-naftiletilendiamina
NK	Células Natural killer
Nm	Nanómetro
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₂ -	Nitritos
NO ₃ -	Nitratos
O ₂	Dioxígeno
OAT	Ornitina aminotransferasa
ODC	Ornitina descarboxilasa
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS	Tampón fostato salino
PGE2	Prostaglandina E2
pH	Potencial de hidrógeno
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSH	Tioles
RSNO	S-nitrosotioles derivados del óxido nítrico
SAMPs	Patrones moleculares asociados a lo propio
SDS-PAGE	Dodecil sulfato sódico electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SOCS3	Supresor de la señalización de citocina 3
SR	Receptores tipo scavenger
TAMPs	Patrones moleculares asociados a tumores
TGM2	Proteína transglutaminasa
TLR2	Receptor Toll like 2
TLR4	Receptor toll like 4
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRS	Solución de recuperación de antígeno
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
μ l	Microlitros
μ m	Micrómetro
^{14}C	Carbono 14
$^{14}\text{CO}_2$	Dióxido de carbono 14

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Activadores, marcadores, citocinas y quimiocinas en células M1 y M2.

Cuadro 2.- Diseño del experimento. Grupos y desafíos.

Cuadro 3.- Distribución de tratamientos *in vitro*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Metabolismo de la arginina en células M1.

Figura 2.- Metabolismo de la arginina en células M2.

Figura 3.- Fundamento de la reacción de Griess.

Figura 4.-Reacción del ensayo de la actividad de la arginasa.

Figura 5.- Cámara de Neubauer. Cuadros utilizados para el conteo de esporas.

Figura 6.- Cámara de Neubauer. Cuadros utilizados para el conteo de células.

Figura 7.- Cultivo de células Vero infectadas.

Figura 8.- Célula Vero infectada.

Figura 9.- Tinción de Calcoflúor White muestra de orina negativa.

Figura 10.- Tinción de Calcoflúor White muestra de orina positiva.

Figura 11.- Cultivo primario de células peritoneales.

Figura 12.- Inmunofluorescencia marcador de macrófagos.

Figura 13.- Inmunofluorescencia de controles positivos M1 y M2.

Figura 14.- Cuantificación de la señal de fluorescencia de controles positivos M1 y M2 de ambos grupos.

Figura 15.- Macrófagos peritoneales 3 días post infección *in vitro*.

Figura 16.- A. Inmunofluorescencia de células sin estímulo *in vitro*. B. inmunofluorescencia de células infectadas *in vitro* con espora viable grupo A.

Figura 17.- Inmunofluorescencia de células infectadas *in vitro* con espora muerta por calor grupo A.

Figura 18.- Inmunofluorescencia de células infectadas *in vitro* con espora inactivada en formol grupo A.

Figura 19.- Inmunofluorescencia de células sin estimular grupo B.

Figura 20.- Inmunofluorescencia de células infectadas *in vitro* con espora viable grupo B.

Figura 21.- Inmunofluorescencia de células infectadas *in vitro* con espora muerta por calor grupo B.

Figura 22.- Inmunofluorescencia de células infectadas *in vitro* con espora inactivada en formol grupo B.

Figura 23.- Cuantificación de la señal positiva para iNOS y Arg-1 de los desafíos del grupo A.

Figura 24.- Cuantificación de la señal positiva para iNOS y Arg-1 de los desafíos del grupo B.

Figura 25.- Cuantificación general de la señal positiva para iNOS y Arg-1 de ambos grupos.

Figura 26.- Concentración de nitritos en el sobrenadante de los cultivos celulares.

Figura 27.- Cuantificación de la actividad de Arg-1 en el sobrenadante y lisado celular.

RESUMEN

Introducción. *Encephalitozoon cuniculi* es un parásito intracelular obligado formador de esporas, perteneciente al género Microsporidia. La participación de la respuesta inmune humoral como celular ante esta enfermedad se desconoce y la mayoría de los estudios se centran en análisis serológicos, patológicos y coprológicos. La línea de defensa más importante contra patógenos intracelulares son los macrófagos, los cuales tienen un rol decisivo en la erradicación o diseminación de la Encephalitozoonosis. Los macrófagos determinan el curso de una enfermedad promoviendo repuestas de tipo Th1, como mecanismo de ataque, o tipo Th2 para la regeneración. A su vez, los macrófagos también son infectados por este microsporidio. **Objetivo.** El propósito de este trabajo consistió en estudiar la polarización del macrófago como factor determinante en el control o propagación de la enfermedad. **Material y Métodos.** Se midió la expresión diferencial de iNOS (macrófago M1) y Arg-1 (macrófago M2), para identificar el fenotipo del macrófago ante la infección *in vivo* y posterior desafío *in vitro*. Se emplearon células peritoneales de ratones Balb/c, los cuales se dividieron en dos grupos: clínicamente sanos (A), e infectados (B) experimentalmente con esporas vivas de *Encephalitozoon cuniculi*. Los macrófagos fueron desafiados *in vitro* con diferentes presentaciones antigénicas de la espora de *E. cuniculi* (viables, muertas por calor e inactivadas en formol). Se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta con el uso de anticuerpos monoclonales mAc para caracterizar a los macrófagos M1 (iNOS) y macrófagos M2 (Arg-1). **Resultados.** En animales clínicamente sanos, la población predominante de macrófagos peritoneales fue del tipo M2. Durante la infección crónica se eleva la expresión de macrófagos M2. El desafío *in vitro* con la espora viable del grupo de animales sanos incrementó la población de macrófagos M1, mientras que el desafío *in vitro* con esporas vivas del grupo de animales infectados no ocasionó incremento de iNOS ni Arg-1. El desafío con la espora muerta por calor del grupo A activó tanto a macrófagos M1 como M2. En contraste, el grupo B mostró inactivación de macrófagos M2 al ser desafiados *in vitro* con las esporas muertas por calor. El grupo A desafiado *in vitro* con la espora inactivada en formol obtuvo la mayor activación de macrófagos M1 a diferencia del grupo B en donde no se detectó activación de M1 ni de M2. **Conclusiones.** Durante la infección crónica con esporas vivas

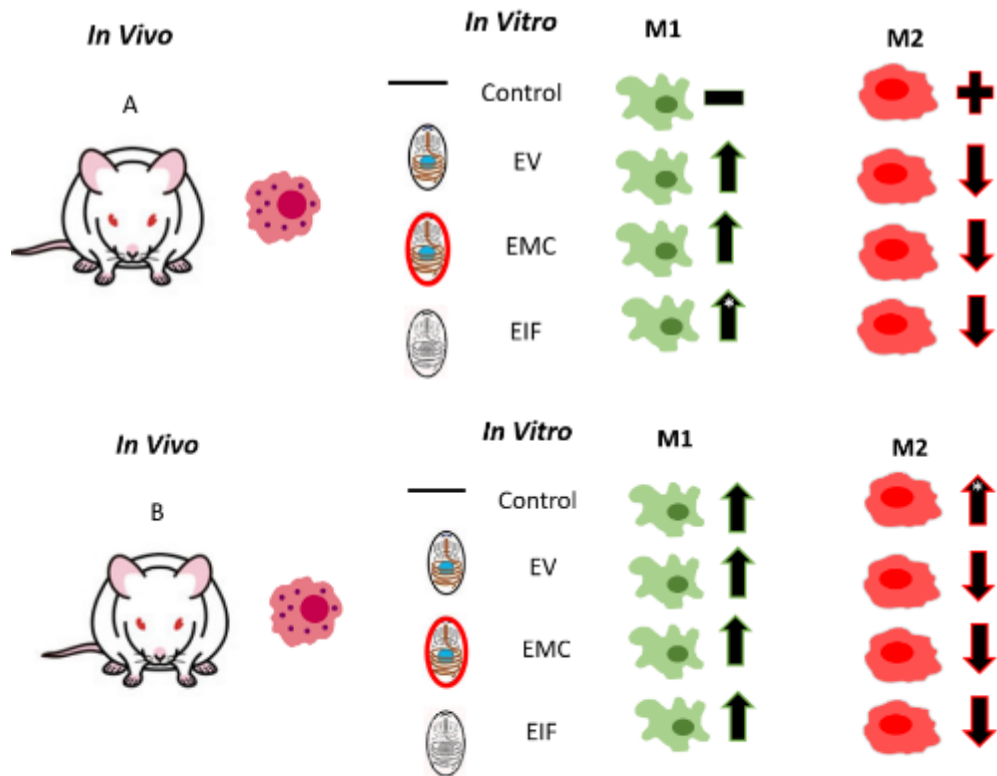
de *Encephalitozoon cuniculi* se activaron macrófagos M2 en animales del grupo B aumentando el ambiente anti-inflamatorio lo que resulta ser beneficioso para *E. cuniculi*. En el desafío *in vitro* con la espora viva (EV) ni con la espora inactivada en formol (EIF) de *Encephalitozoon cuniculi*, no se encontró una activación significativa de los macrófagos. Los macrófagos M2 fueron inactivados con la espora muerta por calor (EMC) durante el desafío *in vitro*. Los macrófagos M1 y M2 mostraron una coexistencia balanceada durante el desafío *in vitro* bajo el estímulo de las diferentes presentaciones antigénicas de las esporas de *Encephalitozoon cuniculi*.

ABSTRACT

Introduction. *Encephalitozoon cuniculi* is an obligate intracellular, spore-forming microorganism belonging to microsporidium genus. The involvement of the humoral and cellular immune response to this disease is unknown so far and most studies focus on serological, pathological and stool analysis. The most important line of defense against intracellular pathogens are macrophages, which play a decisive role in the eradication or dissemination of Encephalitozoonosis. Macrophages determine the course of a disease by promoting Th1-type responses as a killing mechanism or Th2-type for healing. In turn, macrophages are also infected by this microsporidium. **Objective.** The purpose of this work was to study macrophage polarization as a determining factor in the control or spread of the disease. **Material and methods.** Polarization was determined by measuring the differential expression of iNOS and Arg-1 to identify the macrophage phenotype *in vivo* and *in vitro* after infection. For this, peritoneal cells were obtained from Balb / c mice, which were divided into two groups: clinically healthy (A) and experimentally infected (B) with live *Encephalitozoon cuniculi* spores. Macrophages were challenged *in vitro* with different antigenic presentations of *E. cuniculi* spores (viable EV, heat-killed EMC and inactivated in formalin EIF). The indirect immunofluorescence technique was used with monoclonal antibodies mAbs to characterize M1 macrophages (iNOS) and M2 macrophages (Arg-1). **Results.** In clinically healthy animals, the predominant population of peritoneal macrophages was M2 type. During chronic infection, the expression of M2 macrophages was increased. The *in vitro* challenge with the viable spore of the healthy animal group increased the population of M1 macrophages, while the *in vitro* challenge with live spores in the infected animal group did not cause an increase in iNOS or Arg-1. The challenge with the heat-killed spore from group A activated both M1 and M2 macrophages. In contrast group B showed inactivation of M2 macrophages when challenged with dead spores *in vitro*. Group A challenged *in vitro* with the inactivated in formalin spore obtained the highest activation of M1 macrophages, unlike group B where neither M1 nor M2 activation was detected. **Conclusions.** During chronic infection with live *Encephalitozoon cuniculi* spores, M2 macrophages were activated in group B animals, increasing the anti-inflammatory environment, which turns to be beneficial of *E.*

cuniculi. There was no significant activation in the *in vitro* challenge with the EV or the EIF. M2 were inactivated during the *in vitro* challenge with EMC. The M1 and M2 macrophages showed a balanced coexistence during the challenges *in vitro* under the stimulus of the different antigenic presentations of the spore of *Encephalitozoon cuniculi*.

RESUMEN GRÁFICO



A/B	Grupo experimental		Macrófagos M1
	Macrófagos peritoneales		Macrófagos M2
—	Sin desafío	—/+	Proporción menor o mayor de M1 y M2
	Espora viable	↓	Descenso en la señal con respecto al control
	Espora muerta por calor	↑	Aumento en la señal con respecto al control
	Espora inactivada en formol	*	Tratamiento con diferencia significativa

1. INTRODUCCIÓN

Encephalitozoon cuniculi (*E. cuniculi*) es un microorganismo eucariótico, esporulado, intracelular obligado, que ha sido asociado filogenéticamente al reino Fungi y pertenece al filo Microsporidia. La encephalitozoonosis es considerada como una enfermedad zoonótica y emergente (Mathis *et al.*, 2005), que puede infectar a lagomorfos, roedores, primates, herbívoros, carnívoros, réptiles y aves (Künzel & Joachim, 2010). Esta es una infección muy común presentando así un gran problema de salud al trabajar con animales en laboratorios, bioterios, granjas de producción, tiendas de mascotas y animales de compañía, desarrollando un riesgo zoonótico también para el personal que trabaja directamente con dicha especie (Rosell & de la Fuente, 2009). El incremento en los reportes por *E. cuniculi* en individuos inmunocomprometidos a los cuales les ocasiona una severa encefalitis y nefritis granulomatosas, es lo que ha dado parte a la relevancia que tiene este microsporidio como enfermedad emergente y zoonótica (Weber *et al.*, 1997).

Las esporas, cuando son ingeridas, infectan células epiteliales del tracto digestivo, y luego son transportadas por leucocitos inter epiteliales mediante vía sanguínea o linfática hacia el encéfalo y riñón, en donde generan una severa respuesta granulomatosa caracterizada por el reclutamiento de macrófagos y linfocitos (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2016). La respuesta inmune innata celular es la primera línea de defensa contra agentes patógenos intracelulares, la cual puede inducir un proceso inflamatorio crónico (Zumla & Geraint James, 1996). Los macrófagos, células dendríticas y células NK son un ejemplo de la respuesta innata celular temprana, los cuales pueden ayudar a desencadenar la respuesta inmune adaptativa (Ghosh & Weiss, 2011). *E. cuniculi* es considerado como uno de los parásitos más eficientes, ya que durante la infección se establece una relación balanceada entre la respuesta inmune del huésped y una adaptación del agente, lo cual pudiera explicar porque los signos clínicos no son perceptibles durante el inicio de la enfermedad (Bargielowski & Koella, 2009).

Este estudio permitió evidenciar que *E. cuniculi* puede estimular la respuesta inmune del huésped, después de exponer sus esporas a tres distintos tratamientos: 1) esporas viables,

2) esporas muertas por calor (sometidas a una temperatura de 90°C), y 3) esporas inactivadas con formol (sumergidas en formalina tamponada al 10%). Se evaluó la capacidad de estos microorganismos para ejercer una activación en las células fagocíticas. Para determinarlo se cuantificó la producción de iNOS y Arg-1 por macrófagos inactivos expuestos a una infección y la modulación de dicha respuesta en macrófagos previamente activados con LPS/IFN- γ y con IL-4.

1.1. Justificación

El estudio de los marcadores de macrófagos M1 y M2 permitirá comprender su papel en la respuesta inmune celular durante la infección con esporas de *Encephalitozoon cuniculi*.

1.2. Hipótesis

Encephalitozoon cuniculi activa la expresión diferencial de iNOS y Arg-1 en macrófagos.

1.3. Objetivo General

Estudiar el efecto que las diferentes presentaciones de la espora de *Encephalitozoon cuniculi* ejercen sobre la polarización de macrófagos peritoneales durante la infección en un modelo murino.

1.4. Objetivos Específicos

1.4.1. Estandarizar las condiciones para reconocer macrófagos M1 y M2.

1.4.2. Establecer un modelo de infección con *Encephalitozoon cuniculi*.

1.4.3. Determinar la proporción de macrófagos M1 y M2 como respuesta a la infección.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes de *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi fue observado por primera vez en conejos con parálisis motriz (Wright & Craighead, 1922). En 1964 su nombre científico cambió a *Nosema cuniculi*, el cual fue relacionado con la encefalitis de los conejos y descrita en ese momento como una encefalitis granulomatosa (Lallo *et al.*, 2013). En el año 1969, *E. cuniculi* fue el primer agente microsporidiano de mamíferos que fue aislado de un cultivo de fibroblastos de embrión de ratón y se logró que creciera en un cultivo a largo término (Chumakov *et al.*, 1970). En animales de laboratorio, *E. cuniculi* solía ser un problema frecuente, porque afectaba el estado de salud de los animales, ocasionando infecciones subclínicas, lo cual ocasionaba interferencias con los resultados de los experimentos (Shadduck & Pakes, 1971). Asimismo, este microorganismo fue identificado en un estudio realizado en conejos en 1924 en Chicago (Oliver, 1924) y otro en ratones en el año 1958 en Washington DC (Morris *et al.*, 1956).

En 1976 Sprague estableció el filo Microspora (Lom & Dykov, 1992). Mediante análisis filogenéticos moleculares se ha detectado una relación de los microsporidios cercana a las hongos por eso se encuentran en el reino Fungi (Hirt *et al.*, 1999). Posteriormente, *E. cuniculi* fue detectado en un rango muy amplio de mamíferos, incluyendo roedores, lagomorfos, carnívoros, rumiantes, primates no humanos y en humanos (Didier, 2014), y recientemente *E. cuniculi* ha sido diagnosticado en reptiles y aves (Vergneau-Grosset & Larrat, 2016; Shibasaki *et al.*, 2017). La prevalencia de *E. cuniculi* se incrementó durante la época de la aparición del SIDA-HIV, aunque varios patógenos oportunistas fueron asociados a infecciones sistémicas en infecciones simultáneas con *E. cuniculi* (Kulkarni *et al.*, 2009).

Existen 14 especies de microsporidios que pueden afectar a los seres humanos, los cuales son *Anncaliia algerae*, *Anncaliia connori*, *Anncaliia vesicularum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Enterocytozoon*

bieneusi, *Microsporidium africanum*, *Microsporidium ceylonensis*, *Nosema ocularum*, *Pleistophora ronneafiei*, *Trachipleistophora anthropolopthera*, *Trachipleistophora hominis*, *Vittaforma corneae*) (Didier & Weiss, 2006) De estas especies solamente *Enterocytozoon* y *Encephalitozoon* han sido identificadas en fuentes alimenticias y agua, creando una gran preocupación de esta zoonosis y en la salud pública (Smith & Nichols, 2006).

Se han detectado grupos de individuos inmunocompetentes infectados con microsporidia, entre los que se incluyen turistas y viajeros (Mak, 2004). Sin embargo afecta a niños con desnutrición (Desportes-Livage, 1997), a individuos receptores de trasplantes de órganos (Latib *et al.*, 2001), a personas que usan lentes de contacto (Joseph *et al.*, 2006) y en personas mayores (Didier & Weiss, 2006). Gracias al aislamiento de *E. cuniculi* y a técnicas moleculares, se han reconocido 4 genotipos (I, II, III y IV), de los cuales, el genotipo III ha sido identificado como causa de Encephalitozoonosis en perros y humanos, corroborando así el riesgo potencial de la zoonosis (Reetz *et al.*, 2009).

A la fecha, *E. cuniculi* es considerado como uno de los microsporidios más importantes y como causante de enfermedades infecciosas oportunistas en animales y humanos (Chacin-Bonilla, 2006). El estudio y la aplicación de métodos de diagnóstico mejorados serán de ayuda para establecer la prevalencia del microsporidio en la población. Hasta el momento, la importancia de *E. cuniculi* es medida por ser un microorganismo que afecta a una amplia gama de mamíferos, pero sobre todo por ser una enfermedad zoonótica, representando así una problemática para humanos inmunocomprometidos como inmunocompetentes pero que forman parte de grupos de riesgo como trabajadores de granjas cunícolas, empleados de tiendas de mascotas, así como los dueños de conejos como animales de compañía (Ashmawy *et al.*, 2011).

2.2. Características de *Encephalitozoon cuniculi*

Encephalitozoon cuniculi es un microorganismo perteneciente al filo Microsporidia. Es considerado un parásito intracelular obligado, formador de esporas, de forma oval con unas medidas de 1.0-3.0 x 1.5-4.0 μm de tamaño (Didier *et al.*, 2004). Aunque carece de estructuras vitales como las mitocondrias, el complejo de Golgi y los peroxisomas, los cuales son esenciales para la mayoría de las células eucariotas *E. cuniculi* es considerado un organismo eucarionte (Ghosh *et al.*, 2014), depende completamente del metabolismo de la célula hospedera (Ghosh & Weiss, 2011). En el citoplasma de este microorganismo se encuentra el núcleo, la vacuola posterior (que pareciera funcionar como peroxisoma), vesículas polares o mitosomas, disco de anclaje, polaroplasto (que podría ser considerado como un aparato de Golgi rudimentario) y el túbulo polar (aparato de infección) (Han & Weiss, 2017). La espora está conformada por dos capas: la capa externa o exospora, la cual está formada de glicoproteínas, mientras que la capa interna o endospora está formada de quitina, la cual le confiere alto grado de protección en el medio ambiente (Didier & Weiss, 2006).

2.3. Ciclo de vida e Infección a las células

La principal forma de infección de *E. cuniculi* es mediante la vía digestiva. Esto es mediante la ingestión de comida o agua contaminada o por medio de orina infectada con esporas (Wang *et al.*, 2012). Primeramente, la espora infecta a los enterocitos y a través de las placas de Peyer o por medio de linfocitos inter epiteliales se disemina a través del flujo sanguíneo o el sistema linfático (Weischer, 2000). También se puede realizar la diseminación por medio de células fagocíticas localizadas en el epitelio intestinal, las cuales migran hacia otros órganos parenquimatosos (Rodríguez-Tovar *et al.*, 2017).

El método usado por los microsporidios para invadir nuevas células hospederas es uno de los mecanismos más controversiales y sofisticados dentro de la biología y asegura que el microorganismo pueda internalizarse en la célula blanco sin ser reconocido por los mecanismos de defensa del hospedador (Franzen, 2005). El género *Encephalitozoon*

puede infectar a un amplio rango de células entre las que se incluyen células epiteliales, endoteliales, tubulares y macrófagos (Tosoni *et al.*, 2002).

Existen dos vías en las que *E. cuniculi* puede ingresar a la célula: 1) Cuando se presentan las condiciones favorables para el Microsporidio, éste lleva a cabo la descarga del túbulo polar, mediante el cual penetra a la célula blanco y establece el acceso al citoplasma. El túbulo polar tiene un diámetro muy estrecho de 0.1 – 0.2 μm , una longitud de 50-100 μm y sale de la espora con una presión considerable (Keohane *et al.*, 1996) Una vez dentro de la célula el tubo polar descarga su contenido infectivo conocido como esporoplasma. Después pasa al estado de merogonia, en donde formará una vacuola parasitófora conteniendo merontes. Estos se reproducen por fisión binaria y se desarrollan a esporontes, los cuales se dividen a esporoblastos, los cuales se desarrollarán como esporas maduras. Finalmente, las nuevas esporas son liberadas por la célula infectada. (Bigliardi, 2009). 2) Otra manera de ganar el acceso al interior de la célula es por medio de endocitosis mediada por fagocitosis, proceso dependiente de la actina (Couzinet *et al.*, 2000). Una vez que se forma el fagosoma, la espora descarga su tubo polar hacia el citoplasma del huésped liberando el esporoplasma en una vacuola parasitófora que impide la fusión endolisosomal (Khan *et al.*, 2001). A partir de aquí, inician las etapas de la merogonia y esporogonia (Franzen *et al.*, 2005). El proceso culmina con la liberación de esporas maduras hacia el medio ambiente a través de la orina o excremento. Antes de que esto ocurra, es posible observar una hipertrofia de la célula huésped- xenoma (Franzen, 2005).

2.4. Respuesta inmune

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa contra agentes patógenos, la cual puede inducir un proceso inflamatorio (Wang *et al.*, 2019). Los macrófagos, células dendríticas y células NK son un ejemplo de la respuesta innata temprana, las cuales pueden ayudar a desencadenar la respuesta inmune adaptada o específica (Lacy & Stow, 2011). *Encephalitozoon cuniculi* es considerado como uno de los parásitos más eficientes, ya que durante la infección se establece una relación balanceada entre la respuesta inmune del

huésped y una adaptación del agente, lo cual pudiera explicar porque los signos clínicos no son perceptibles durante la enfermedad (Jeklová *et al.*, 2019).

Los argumentos que implican la participación de la inmunidad celular durante una infección por *E. cuniculi* son: 1) Causa lesiones granulomatosas; 2) Es un patógeno intracelular estricto; 3) La respuesta inmune humoral parece no ser efectiva; 4) Las células participantes son macrófagos y linfocitos T y, 5) La respuesta inmune es inhibida por los corticosteroides (Nevárez-Garza *et al.*, 2018). Las lesiones más comunes causadas por *E. cuniculi* en roedores son de carácter granulomatoso en el riñón, localizados principalmente en la médula renal causando una nefritis granulomatosa multifocal. En el encéfalo se desarrolla una severa meningoencefalomielitis granulomatosa multifocal no supurativa (Künzel & Fisher, 2018).

2.5. Macrófagos

Son células fagocíticas que se originan en la médula ósea y maduran en los tejidos. Son extremadamente efectivas en la eliminación de microorganismos intracelulares, cuando son apropiadamente activados por las células linfoides (Tizard, 2018). Los macrófagos están considerados como una de las poblaciones celulares con una alta plasticidad, las cuales se encuentran prácticamente en todos los órganos. Los macrófagos presentan una amplia diversidad funcional, como por ejemplo en la homeostasis, en la inmunidad y en la reparación de tejidos (Locati *et al.*, 2020) Su función principal es la de identificar y fagocitar agentes patógenos, seguido de la estimulación de la respuesta inmune adaptativa mediante el procesamiento y el reconocimiento del antígeno (De Sousa *et al.*, 2019). Los macrófagos inicialmente son reclutados como monocitos desde la sangre y médula ósea, a partir de los tejidos periféricos o mediante la proliferación local, para eliminar microorganismos como los microsporidios, los cuales pueden persistir ante la acción de los neutrófilos (Gundra *et al.*, 2014; Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018).

Los macrófagos han evolucionado creando una serie de estrategias para pelear contra infecciones causadas por parásitos intracelulares como *E. cuniculi*. Entre estas estrategias se incluyen: 1) La inducción de sustancias antimicrobianas como el Óxido Nítrico (NO)

y especies reactivas de oxígeno (ROS) (Fang, 2004). 2) La intoxicación del microsporidio por medio de la acidificación en el fagolisosoma (alrededor de un pH=5) (Flannagan *et al.*, 2009). 3) Restricción de nutrientes esenciales para el microorganismo como el hierro, aminoácidos o ácidos grasos (Nairz *et al.*, 2010). 4) producción de péptidos y citocinas anti- microbianas junto con la inducción de la autofagia para la eliminación del patógeno (Weiss & Schaible, 2015).

2.6. Activación y polarización del macrófago (M1 y M2)

En el año 2000 se propuso una clasificación de los fenotipos de los macrófagos en macrófagos M1 y M2 (Metchnikoff, 2015). Los macrófagos son activados por la interacción de diferentes moléculas, dándose una diferenciación entre macrófagos, la cual también es llamada polarización de células M1 y M2 (Soldano *et al.*, 2018). Esta activación implica modificaciones funcionales, morfológicas y bioquímicas para dos propósitos principales, las cuales son la inducción o la resolución de la inflamación (Liu *et al.*, 2014).

El papel que los macrófagos tienen dentro de la respuesta inmune contra *E. cuniculi*, además de ser una de las células que pueden llegar a infectarse con este parásito, tiene el papel preponderante de desencadenar la respuesta inmune adaptativa de acuerdo con el fenotipo dominante, es decir, macrófagos M1 o M2. Estas células pueden dirigir la actividad de los linfocitos T para presentar una respuesta de tipo Th1 o Th2 respectivamente (Mills *et al.*, 2020).

Los macrófagos responden a estímulos de señal de peligro (Matzinger, 2002), que son identificados por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) que se encuentran en la superficie, citoplasma y en vesículas intracelulares de células fagocíticas (Zindel & Kubes, 2020). Estas señales se clasifican como PAMPs, MAMPs, DAMPs, SAMPs, TAMPs (Lakhtin *et al.*, 2018). Los principales patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son ácidos nucleicos, lipoproteínas, glicoproteínas de superficie y componentes de las membranas microbiales, que al ser detectados por los PPRs dan inicio

a las señales celulares para indicar la presencia de una infección microbiana, se inicia el proceso de inflamación y comienzan las respuestas microbicidas por medio de la señalización de moléculas adaptadoras, quinasas y factores de transcripción nuclear (Tang *et al.*, 2013). El cambio en la polarización es rápido e involucra una cadena de señalizaciones tanto a nivel transcripcional como traslacional (Metchnikoff, 2015). Moléculas asociadas a microbios (MAMPs) también son reconocidas por PPRs, estos son componentes pertenecientes a microorganismos no patógenos como por ejemplo la microbiota intestinal que son bacterias inocuas que no estimulan la inflamación ni el inicio de la inmunidad (Kamada *et al.*, 2013). Los patrones moleculares asociados a daño celular (DAMPs) son moléculas derivadas de las propias células y estos pueden iniciar el proceso inmune en respuesta a isquemia, trauma, cáncer o daños a tejido en ausencia del componente patogénico, estas moléculas pueden ser ATP, material genético, ácido úrico o heparán sulfato que al reconocidos por PPRs desencadena la supervivencia o muerte celular (Seong & Matzinger, 2004). Los patrones moleculares asociados a lo propio (SAMPs) como su nombre lo indica es lo perteneciente al organismo, que al ser reconocidos por los receptores celulares no activa la respuesta inmune como por ejemplo en condiciones normales células que circulan por el torrente sanguíneo sin causar alteraciones (Varki, 2011). Las células de la inmunidad innata también tienen la capacidad de reconocer antígenos tumorales o patrones moleculares asociados a tumores (TAMPs) este reconocimiento es indispensable para el establecimiento de una respuesta inmune antitumoral efectiva.

Cuando los macrófagos son activados por PAMPs o modulados por citocinas del tipo Th1 como IFN- γ y LPS, se genera una serie de moléculas como citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular y productos tóxicos como el NO y ROS, los cuales están dirigidos a destruir agentes patógenos (Franzen *et al.*, 2005). Esta activación es conocida como la vía clásica y a los macrófagos activados clásicamente denomina M1 estas células presentan un fenotipo proinflamatorio y microbicida (Yunna *et al.*, 2020). Una vez que el estímulo patogénico ha sido eliminado, empieza el periodo de reconstrucción tisular, se remueven las células apoptóticas o necróticas, se estimula la producción de colágeno, reclutamiento de fibroblastos y producción de factores angiogénicos, entre otras

reacciones. (Murray *et al.*, 2014). Durante este proceso la señal de los DAMPs ya fue reconocida por los macrófagos y estos a su vez son activados por citocinas del tipo Th2, como la IL-4 e IL-10. (Oishi *et al.*, 2016). En este otro tipo de activación, los macrófagos se polarizan hacia un fenotipo antiinflamatorio M2 llamados también macrófagos alternativamente activados (Soldano *et al.*, 2018).

Los macrófagos M1 activados en la forma clásica producen citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-12, IL-23, y elevados niveles de NO sintasa (iNOS) (Neworal *et al.*, 2003). Los macrófagos M2 activados en la forma alternativa producen citocinas antiinflamatorias como IL-10, TGF- β , las cuales inhiben la producción de IFN- γ y antagoniza la generación de células de M1 (Cherry *et al.*, 2014). Los macrófagos M2 son importantes en la resolución de la respuesta inflamatoria y son las células que inician las actividades de remodelación de los tejidos dañados y la formación de nuevos vasos sanguíneos (Wynn *et al.*, 2013).

2.6.1. Plasticidad del macrófago

El microambiente celular puede llegar a cambiar de acuerdo con el tiempo de exposición del patógeno o a la resolución de este por lo tanto los macrófagos tisulares residentes también cambian su funcionalidad y fenotipo (Davis *et al.*, 2013) A este proceso de cambio se la llama reprogramación. También se conoce a la fecha que no existen poblaciones puras de macrófagos M1 y M2. Sería más preciso identificar las líneas por la mayoría de los marcadores encontrados ya sean M1 o M2. Por lo que se acepta el término de plasticidad celular el cual describe cambios continuos y dinámicos de fenotipo M1 a M2 o viceversa (Malyshev & Malyshev, 2015).

2.7. Metabolismo de la Arginina.

Tanto macrófagos M1 y M2 necesitan de la arginina para llevar a cabo sus vías metabólicas y producir las enzimas que caracterizaran su fenotipo, ambos tipos celulares (pro y anti-inflamatorio) compiten por el mismo sustrato (Yeramian *et al.*, 2006). Inicialmente la arginina se dio a conocer como un aminoácido necesario para formar

proteínas en animales. El papel de la arginina en el metabolismo fisiológico fue demostrado cuando se descubrió el ciclo de la urea por Krebs y Henseleit. (Rath *et al.*, 2014). Los seres vivos obtienen la arginina por tres vías: la ingesta en los alimentos/suplementos, a partir de la degradación de proteínas celulares o mediante la producción endógena del aminoácido (Munder *et al.*, 1999). A nivel de un organismo, la arginina es un componente que se involucra en la inflamación, infecciones, cáncer, preñez, enfermedades fibróticas y en la regulación de la inmunidad en general. (Kropf *et al.*, 2007; Munder, 2009; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Noy & Pollard, 2014).

La arginina es un precursor del NO, urea, poliaminas, prolina, glutamato, creatina y agmatina. Los macrófagos M1 y M2 difieren en como metabolizan la arginina, la cual es mediante dos vías conocidas: la del inductor del óxido nítrico sintasa (iNOS) y la de la arginasa-1 (Arg-1), respectivamente (Mills, 2012).

2.7.1. Vía de iNOS y producción de NO. (Macrófagos M1)

En los macrófagos M1, la enzima que convierte a la arginina en NO es conocida como NOS, cuya expresión en los macrófagos se da mediante la inducción transcripcional y es controlada por citocinas de tipo Th1 como IL-12 e IFN- γ y productos microbianos, como el LPS. (Li *et al.*, 2012). Existen tres isoenzimas de NOS: nNOS (neuronal), eNOS (endotelial), e iNOS (inducida) Estas difieren en su distribución, estructura y capacidad para sintetizar el NO (nNOS y eNOS son dependientes de calcio) pero desencadenan la misma reacción, la cual lleva de por medio dos pasos de monooxigenación; primero la arginina es hidroxilada por O_2 y NADPH para formar N-hidroxy-L-arginina. Este compuesto en una segunda reacción es oxidada por NOS para producir NO y L-citrulina (Rath *et al.*, 2014) . Finalmente la citrulina es convertida en L-argininosuccinato por acción de la enzima argininosuccinato sintasa (ASS), la cual se reincorpora al ciclo y por la intervención de la enzima argininosuccinato liasa (ASL), vuelve a producirse arginina (Morris, 2004)

El NO es conocido por sus propiedades vasodilatadoras y es considerado un regulador del metabolismo celular. (Levine *et al.*, 2012). Es pro inflamatorio, inhibe la proliferación celular y tiene efectos positivos en la eliminación de microorganismos intracelulares al

interactuar con ROS (Cabral *et al.*, 2018). Lo anterior es mediante los siguientes mecanismos: Daños en el DNA microbiano por des-aminación, creando rupturas en las cadenas nucleotídicas y alterando los sistemas de reparación. Igualmente, genera un catabolismo proteico, agotamiento de hierro, acciones en enzimas metabólicas que llevan a la alteración de la fuerza motriz protón transmembrana, bloquea la transducción de señales fisiológicas por medio de interacciones con las proteínas hemo como la inactivación de la catalasa y la guanilil ciclasa (Figura 1) (Tripathi *et al.*, 2007).

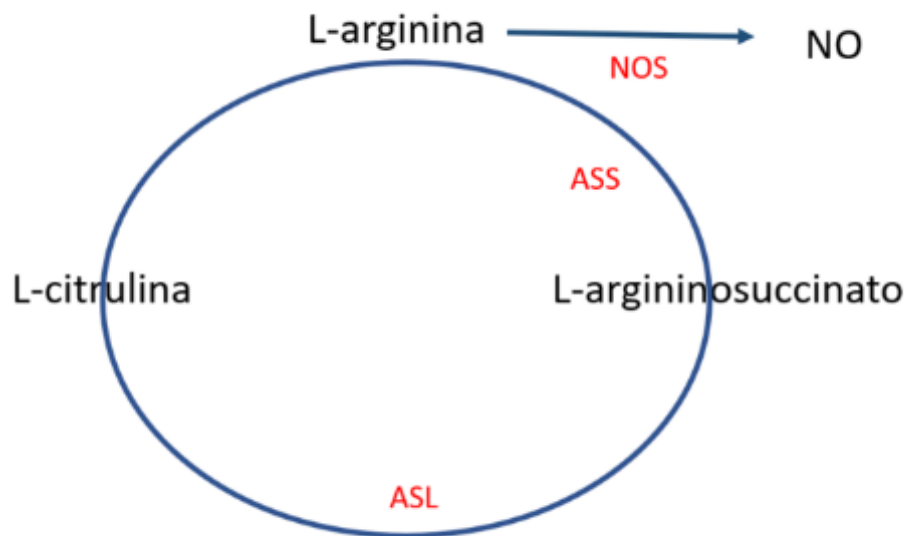


Figura 1. Modificado de (Wu & Morris, 1998). Ejemplificación del metabolismo de la arginina en células M1. Enzimas involucradas en rojo Óxido Nítrico Sintasa (NOS), Argininosuccinato Sintasa (ASS), Argininosuccinato Liasa (ASL).

2.7.2. Vía de la Arginasa (Macrófagos M2)

En los macrófagos M2, la enzima arginasa es la encargada de la vía alternativa del metabolismo de la arginina, la cual cataliza la hidrólisis de ésta hacia ornitina y urea. Existen dos isoformas de la arginasa (Arg-1 y Arg- II), las cuales difieren en la expresión celular, la localización y regulación en células específicas (Munder, 2009). La Arg- 1 es un componente del ciclo de la urea, es una enzima citosólica y se produce en grandes cantidades por el hígado; mientras que la Arg- II es una enzima mitocondrial, la cual se expresa en menores proporciones en los macrófagos, cerebro, riñones, intestino delgado y en glándulas mamarias. (Li *et al.*, 2020). En los macrófagos, la arginasa es inducida principalmente por citocinas anti- inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13 del tipo Th2, por prostaglandina E2 (PGE2) y cAMP actuando en conjunto o por separado (Munder *et al.*, 1999).

Los productos del metabolismo de la arginina por la vía de la arginasa son: 1) Urea, como parte del ciclo de la urea hepático y 2) Ornitina, la cual da lugar a poliaminas, mediante la acción de la enzima ornitina descarboxilasa, que tiene un efecto positivo en actividades celulares, tales como la proliferación y en el transporte a través de la membrana. De la ornitina también se metaboliza prolina, mediante la enzima ornitina transcarbamilasa, que es un componente esencial para la formación de colágeno (Figura 2) (Rath *et al.*, 2014).

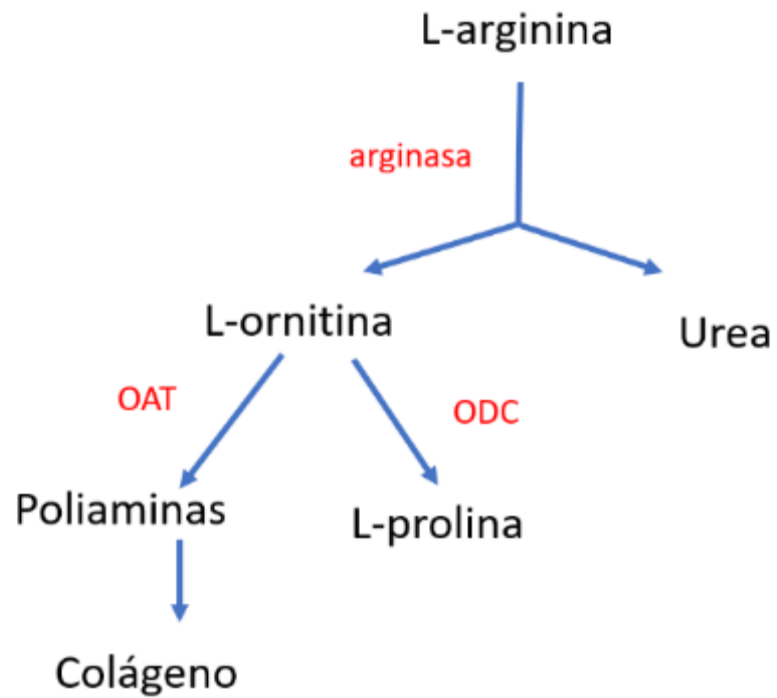


Figura 2. Modificado de (Munder, 2009) diagrama del metabolismo de la L-arginina por la vía de la arginasa en células M2. En rojo las enzimas participantes ornitina aminotransferasa (OAT) y ornitina descarboxilasa. (ODC).

2.8. Marcadores de macrófagos M1 y M2

Los macrófagos M1 expresan marcadores en su superficie a la molécula (CD68), así como moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD80). Igualmente se producen elevados niveles del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) (Metchnikoff, 2015), el receptor de interleucina-1 (IL-1R), el cual que propaga la señalización proinflamatoria (Spitzer *et al.*, 2019), PRRs como TLR2 y TLR4, que contribuyen a la inflamación (Quero *et al.*, 2017). También se ha encontrado que estas células M1 tienen una elevada expresión de la proteína intracelular supresora de la señalización de citocina 3 (SOCS3) (Arnold *et al.*, 2014). La enzima iNOS es una proteína homodimérica, con un peso molecular de 131kDa y es de carácter inducido por lipopolisacáridos bacterianos y citocinas proinflamatorias mayormente, es un marcador distintivo para la identificación de macrófagos M1 en donde cumple funciones de defensa inmune contra agentes intracelulares y de promoción de la inflamación (Sessa & Fo, 2012). Los macrófagos M2 son inducidos por compuestos de hongos (ej. quitina), complejos inmunes, infecciones por parásitos como *Leishmania* (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018) y *Schistosoma mansoni* (De Sousa *et al.*, 2019), células apoptóticas y citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-13, IL-10 y TGF- β (Mills *et al.*, 2020). Los macrófagos M2 expresan en su superficie las moléculas (CD163 y CD204), receptores tipo scavenger (SR), altos niveles del receptor de manosa (MMR) (den Haan & Martinez-Pomares, 2013), el receptor CD200R, la proteína transglutaminasa TGM2 y , específicas de ratón, como Ym1, Fizz1 y Arg-1 (Roszer, 2015). La Arg-1 es una proteína citoplasmática con un peso molecular de 35kDa, y es expresada en su mayoría por las células del hígado y por macrófagos. La Arg-1 cataliza el paso final en el ciclo de la urea y tiene una participación en las reacciones antiinflamatorias en el sistema inmune (Ruth *et al.*, 2015). Para fines de este trabajo se seleccionó a la enzima iNOS como marcador para la identificación de células M1 y la Arg-1 como marcador para células M2, debido a la especificidad de cada uno, son las más recomendadas por la literatura en modelos murinos, y a la disponibilidad de anticuerpos. (Kigerl *et al.*, 2009). Para distinguir entre los fenotipos de macrófagos, se han identificado diferentes biomarcadores específicos (Cuadro 1) (Metchnikoff, 2015).

Cuadro 1. Principales activadores, marcadores, citocinas y quimiocinas involucrados en macrófagos activados clásicamente (M1) y alternativamente (M2). Tomado de (Metchnikoff, 2015).

CARACTERÍSTICAS	M1	M2
Activadores	IFN- γ LPS GM-CSF	IL-4 IL-10 IL-13 Hongos e infecciones por parásitos.
Expresión de marcadores	CD68 CD86 CD80 MHC II IL-1R TLR2 TLR4 SOCS3 iNOS	CD163 CD204 SR MMR/CD206 CD200R TGM2 Exclusivo de ratón: Ym1/2 Fizz-1 Arg-I
Secreción de citocinas	TNF IL-1 β IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- β IL-1ra
Secreción de quimiocinas	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24

2.9. Métodos para la caracterización del fenotipo de macrófagos

2.9.1. Western blot

La muestra que se utiliza son células lisadas a partir de cultivo celular o de tejidos. Es una técnica *in vitro* para identificar proteínas, en el caso de macrófagos M1 se busca iNOS y para M2 se busca Arg-1, este método consiste en separar las proteínas por peso molecular, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas posteriormente se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno mediante la aplicación de un campo eléctrico (electroblotting) en cámara húmeda. Una vez completada la transferencia de la proteína del gel hacia la membrana, la membrana es bloqueada con polvo de leche al 5% para prevenir la unión inespecífica de anticuerpos. Se utiliza un sistema de inmunodetección indirecta, en donde se realiza una primera incubación de la membrana con un anticuerpo primario (anti-iNOS, anti-Arg-1) dirigido a la proteína iNOS o Arg-1 y una segunda incubación con un anticuerpo secundario que detecta al anticuerpo primario (anti-ratón o anti-conejo). Este último está conjugado con un marcador capaz de producir una señal detectable. El revelado de la reacción está asociado a enzimas que catalizan una reacción o emisión de luz. Principalmente se utiliza la peroxidasa de rábano picante (HRP) en presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2); que se produce en la membrana y revelada en un escáner para hacer visible la señal de iNOS o Arg-1 en el marcador del peso correspondiente que son 131kDa y 35kDa respectivamente (Burnette & Neal 1981).

2.9.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite medir las propiedades de partículas individuales, permitiendo el análisis célula por célula de acuerdo con múltiples parámetros celulares como el tamaño, forma, complejidad y cualquier componente celular que pueda ser marcado con un fluorocromo por medio de la conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales. Los estudios de densidad

permiten identificar subpoblaciones celulares por la distribución de determinantes y receptores celulares tanto de superficie como del citoplasma. En este caso CD68, CD86, CD80, MHC II, IL-1R, TLR2, TLR4, SOCS3 e iNOS para identificar macrófagos M1 y CD163, CD204, SR, MMR/CD206, CD200R, TGM2, Ym1/2, Fizz-1 y Arg-1 para macrófagos M2 (Barrera Ramírez *et al.*, 2004).

El fundamento se basa en pasar una suspensión de partículas (en este caso células) alineadas delante de un haz de laser focalizado. El impacto del rayo de luz con cada célula produce señales correspondientes a parámetros celulares y son almacenados por distintos detectores. Estos datos se convierten en señales electrónicas que posteriormente serán digitalizadas para medir varios parámetros de una sola célula (McKinnon, 2018).

Esta técnica se puede realizar *en vivo* e *in vitro*, la muestra a utilizar puede ser células procedentes de lavados peritoneales o pulmonares, aspirados de médula ósea, sangre periférica y tejidos proveniente de órganos como ganglios, bazo, timo, hígado, piel o intestino y tumores. Las células deben estar a una densidad de 1×10^7 suspendidas en PBS. Si el marcador es intracelular se requiere previa permeabilización de la célula con sustancias detergentes. Para realizar el inmunomarcaje indirecto se realizan alícuotas de 100µl, se añade el anticuerpo primario y se incuba durante 30 min, se hace un lavado y se agrega el anticuerpo secundario para una incubación de 30 min. Una vez establecidos los parámetros requeridos en el citómetro se procede a analizar la muestra (Lysing and Vacuum, 2000).

2.9.3. Inmunohistoquímica

Esta técnica tiene su fundamento en la reacción de antígeno-anticuerpo, principalmente se usa la inmunoglobulina IgG en tejidos embebidos en parafina o en cultivos de celulares fijados a laminillas. Primeramente se realiza un marcaje de las células del tejido o de la muestra citológica con un anticuerpo primario específico dirigido a la proteína de interés el cual será evidenciado por medio de un anticuerpo secundario IgG regularmente conjugado con biotina. La señal puede ser detectada en un microscopio de luz blanca (Ara, 2005). Mediante este procedimiento se puede identificar células M1 por medio de

anticuerpos dirigidos a iNOS y células M2 por medio de anticuerpos para Arg-1 ambas enzimas son de localización citoplasmática.

Primero es necesario desparafinar los tejidos montados en las laminillas; posteriormente rehidratar y desenmascarar el antígeno con TRS (Target Retrieval Solution), después se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrogeno al 3% y el bloqueo de sitios de unión inespecíficos incubando los tejidos con suero de caballo al 10%. Se añade el anticuerpo primario previamente diluido y se realiza una incubación de 24 horas. Al día siguiente se recupera el Ac primario y se realizan lavados con PBS, se agrega el anticuerpo secundario para una segunda incubación de 2 horas. Al terminar la segunda incubación se realizan lavados para agregar el sustrato de peroxidasa-cromógeno, por último, se lavan con agua destilada y se realiza la contra tinción con el procedimiento de hematoxilina y eosina. Las laminillas son montadas con resina sintética y observadas en un microscopio de luz. (Ramos-Vara *et al.*, 2008).

2.9.4. Métodos para analizar la presencia de Óxido Nítrico para medir indirectamente la presencia de células M1

Su detección es fundamental dentro de los estudios de la salud y la enfermedad. Ya que la vida del óxido nítrico (NO) es relativamente corta en los sistemas biológicos (Kelm, 1999) para obtener información acerca de la producción, biodisponibilidad y metabolismo del NO se realiza la cuantificación de sus metabolitos a partir de una muestra biológica (Bryan & Grisham, 2007) Los principales sub productos resultantes en el metabolismo del NO son los nitritos (NO₂⁻) y nitratos (NO₃⁻) (Yoshida and Kasama, 1987).

2.9.4.1. Ensayo de diaminofluoresceína-2.

Este método es utilizado con microscopia de fluorescencia para medir en tiempo real cambios en los niveles de NO *in vivo*. La muestra para utilizar pueden ser células y tejidos, la muestra es incubada con el compuesto de diamino fluoresceína 2 (DAF) en donde la reacción es la nitrolización del grupo diamino dando como resultado una nitrosamina que después de una reorganización forma el triazol fluorescente. Los resultados con

observados bajo un microscopio de luz UV para detectar la reacción de fluorescencia (Schwendemann *et al.*, 2008).

2.9.4.2. Ensayo de diaminonaftaleno

Método fluorométrico para medir la presencia de NO en una muestra a partir de sobrenadante de cultivo celular. por lo regular es una técnica *in vitro* ya que el cultivo suele tener procedencia de lavados de peritoneo o lavados pulmonares. Se utiliza el compuesto diamino aromático 2,3-diaminonaftaleno (DAN) como indicador en la formación de NO. En donde la sustancia no fluorescente DAN reacciona con Óxido de Nitrógeno (N_2O_3) generado de nitritos acidificados o de la interacción del NO con oxígeno para producir 2,3-naftotriazol el cual, si es altamente fluorescente, dependiendo de la concentración de NO en el microambiente, la intensidad se mide por medio de un espectrofluorómetro (Andrew *et al.*, 1997)

2.9.4.3. Detección de S-Nitrosotioles

Método colorimétrico para la detección de NO en muestras a partir de cultivo celular. Las propiedades biológicas de los S-nitrosotioles derivados del NO (RSNO) tienen un lugar importante en la biología del NO. Estos se generan a partir de la auto oxidación de NO en presencia de tioles (RSH). El ion mercurio reacciona con los tioles accesibles y en la detección de RSNO se utiliza la reacción de Saville en la que el mercurio desplaza al ON^+ . El ON_2^- resultante de la descomposición de ON en presencia del O_2 es detectado usando un método colorimétrico para medir el nitrito que se formó de la reacción. La cantidad de NO que se desprende es cuantificada en fase gaseosa por quimioluminiscencia (Jourdeuil *et al.*, 2003).

2.9.4.4. Determinación de productos de nitrito, nitroso y nitrosil

Detecta por quimioluminiscencia la presencia de compuestos nitrosados es una técnica utilizada *in vivo* como *in vitro* ya que se puede realizar a partir de muestras biológicas

como plasma y eritrocitos, como a partir de cultivos celulares. Se utiliza un detector quimio luminiscente basado en ozono. El NO reacciona con el ozono para dar un estado excitado de dióxido de nitrógeno. Al regresar a su estado natural el dióxido de nitrógeno emite una luz la cual es detectada por un tubo fotomultiplicador. La intensidad de la emisión quimioluminiscente (nm) es proporcional la concentración de los compuestos nitrosados existentes en la muestra (Feelisch *et al.*, 2002).

2.9.5. Análisis de Arginasa para medir indirectamente la presencia de células M2

En mamíferos la arginasa cataliza la hidrólisis de la arginina a urea y ornitina. Debido a su expresión en diferentes tipos celulares y el impacto dentro de muchas rutas bioquímicas en la fisiología y durante la enfermedad, existe un gran interés en ensayos que pudieran medir la actividad de la arginasa. Estos ensayos pueden ser espectrofotométrico o radio químicos (Kepka-Lenhart *et al.*, 2008).

2.9.5.1. Método de Schimke.

Método para medir la cantidad de arginasa encontrada en una muestra biológica a partir de tejidos de órganos. Es un ensayo radio químico dependiente de la conversión de productos inmediatos de reacciones enzimáticas. En condiciones de un exceso de arginasa el argininosuccinato (guanidino- ^{14}C) es convertido a (^{14}C) urea y en una segunda etapa después de una incubación con ureasa se determina el $^{14}\text{CO}_2$ colectado, este es estimado colorimétricamente y la actividad detectada se expresa como micromoles de producto formado/mg (Tamir & Ratner, 1963).

2.9.5.2. Ruegg y Rusell.

Es una técnica para medir de forma indirecta la presencia de arginasa *in vitro* en muestras de células. Es un ensayo radio químico para medir la síntesis de argininosuccinato. Utiliza L- guanido- ^{14}C como sustrato que actúa en un exceso de arginasa y ureasa. La arginina

que hidrolizada se elimina durante un procedimiento con resina de sulfonato y el producto de la urea ^{14}C es cuantificado en micro unidades en el sobrenadante de resina. La sensibilidad es de 0.1 micro unidades de arginasa (Zidwick & Rogers, 1982).

2.9. Inmunofluorescencia y microscopía de fluorescencia

La inmunofluorescencia (IFA) se basa en la utilización de anticuerpos conjugados con un fluorocromo y técnicas para visualizar proteínas de interés y otras biomoléculas en tejidos o en muestras de células. Este proceso revela la expresión relativa, localización y estado de activación de la proteína blanco en este caso iNOS para M1 y Arg-1 para M2. Una ventaja es que provee datos que pueden ser cuantificados y graficados. La detección de iNOS y Arg-1 puede ser directa cuando se usa un solo Ac conjugado con el fluorocromo o indirecta cuando se usa un Ac primario (sin conjugar) anti-iNOS y anti-Arg-1 y un Ac secundario conjugado con el fluorocromo en este caso anti-ratón Alexa 488 y anti-conejo Alexa 594 el cual reconoce y se une al primario. Cualquiera de los métodos permite la combinación de diferentes fluoróforos permitiendo realizar doble inmuno marcaje, esta es una herramienta para estudiar la co- localización, cambios en la localización, activación por diversas proteínas, diferenciar entre subtipos celulares y otros análisis (Babu *et al.*, 2013). La microscopía de fluorescencia es de las técnicas y herramientas mayormente empleadas en biología molecular para monitorear la fisiología celular (Lichtman & Conchello, 2005).

La fluorescencia detectada en las muestras es debida a la absorción de energía luminosa por una unidad, seguido de la emisión de luz de una parte de esta energía. Durante este proceso se pierde algo de energía por lo tanto el fotón emitido tendrá menos energía que el fotón absorbido (Thorn, 2016).

Se utiliza luz con diferentes rangos de longitud de onda. Longitud de onda corta que contiene mayor energía (como la luz azul) y longitud de onda larga que es de menor energía (cuando más se acerca al rojo) y por lo regular la luz emitida desde el indicador tiene mayor longitud de onda que la luz absorbida. La separación de la luz emitida de la luz de excitación es llevada a cabo por el empleo de filtros ópticos (Sanderson *et al.*, 2016).

2.10. Reacción de Griess

Una de las técnicas mayormente utilizadas es la de la reacción de Griess que mide indirectamente la actividad del NO al detectar los principales sub productos resultantes de su metabolismo; los nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) (Yoshida & Kasama, 1987) es un método colorimétrico que involucra una medición espectrofotométrica. Este ensayo depende de la reacción de diazotización descrita por Griess (Griess, 1879).

El agente trióxido de dinitrógeno (N_2O_3) generado de la formación ácido-catalizada del ácido nitroso a partir del nitrito o la auto oxidación de NO, reacciona con la sulfanilamida para producir un ion de diazonio que luego se acopla a di clorhidrato *N*-1-naptilenilendamina (NED) bajo condiciones ácidas para formar un azo cromóforo que se absorbe a 540nm. (Grisham *et al.*, 1996). Es posible detectar NO_2 en muestras biológicas y líquidos experimentales con matrices como suero, plasma, orina y medio de cultivo celular. La sensibilidad puede variar de acuerdo con la matriz. El límite de detección es de 2.5 μM de nitrito (Figura 3) (Corporation promega, 2009).

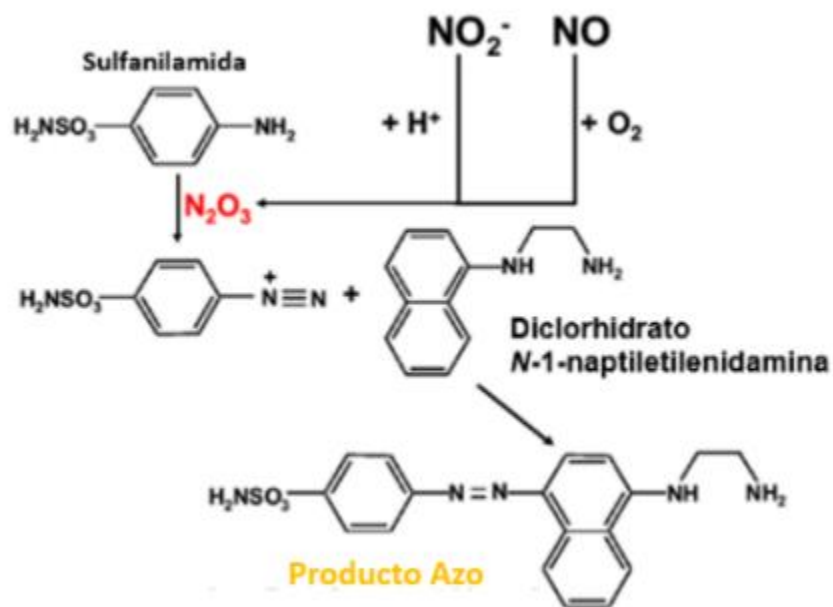


Figura 3. Representación del fundamento en la reacción de Griess. Rojo: metabolitos. Amarillo: producto final que es detectado. Modificado de Griess reagent system (Promega).

2.11. Ensayo de la actividad de Arginasa

Ensayo para medir la actividad de la arginasa en una muestra biológica como preparaciones enzimáticas, suero, plasma y a partir de cultivos celulares. Es un protocolo colorimétrico en donde la arginasa de la muestra cataliza la conversión de la arginina a urea y ornitina. La urea producida reacciona con el reactivo produciendo una coloración proporcional al nivel de la arginasa presente. Una unidad de arginasa es la cantidad de enzima que convierte 1.0 μmol de L-arginina en ornitina y urea por minuto con un pH 9.5 y 37°C. Tiene un límite de detección de 0.3 unidades/L en una reacción de 2 horas (Activity *et al.*, 2020) Para medir la absorbancia se usa un lector de placa a una longitud de onda de 430nm (Figura 4).

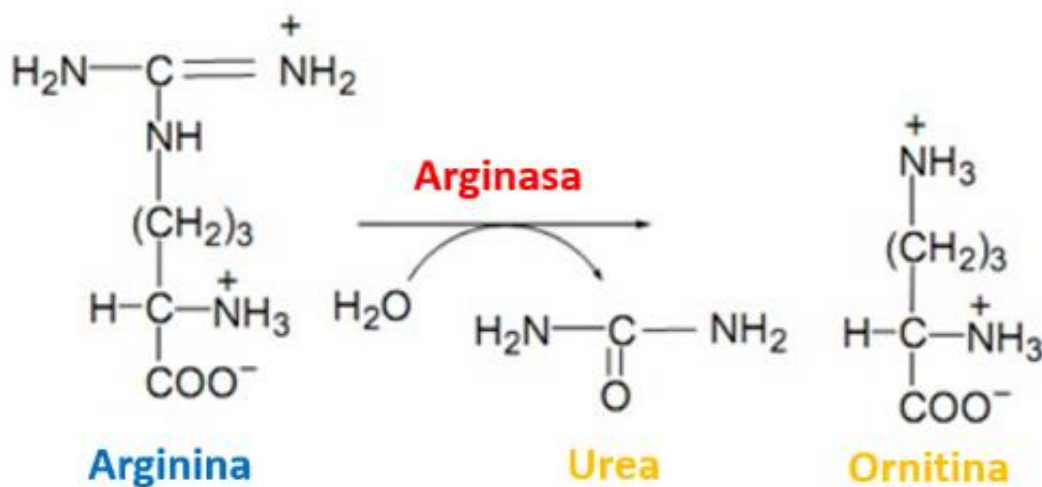


Figura 4. Reacción en donde la arginina es convertida a urea y ornitina por medio de la enzima arginasa. Azul: aminoácido. Rojo: enzima. Amarillo: producto final. Modificado de arginase activity assay (Sigma-Aldrich).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Animales para experimentación

Se utilizaron 14 ratones hembra de la línea Balb/c, con una edad de entre 30-40 días, los cuales fueron alojados en el Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

3.1.2. Mantenimiento y Alojamiento

Los ratones se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y una temperatura ambiente de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Contenidos en jaulas de acrílico de 29x22x14cm, con tapa de rejilla metálica de acero inoxidable (Birdcage, Birds Park, EUA), habilitada con un bebedero de vidrio (60 ml; Redkite, México). Asimismo, los ratones fueron alimentados con alimento comercial (FormuLab Chows 5008; Purina, EUA) y divididos en dos grupos. Las condiciones de manejo fueron establecidas de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y con lo establecido en los Lineamientos del Comité de Bioética y Bienestar Animal de la FMVZ-UANL con el registro de aprobación 02/2019.

3.2. Diseño experimental

La división de los grupos experimentales consistió en: grupo A, animales clínicamente sanos que solo se les inoculó PBS y grupo B, animales infectados experimentalmente con la espora de *E. cuniculi*. Cada grupo consistió en cinco animales distribuidos al azar. Todos los tratamientos iniciaron el día 0 y se mantuvieron bajo las condiciones ya descritas durante un mes para asegurar la infección sistémica. Al día 30 los animales de ambos grupos fueron sacrificados y se recolectaron las células peritoneales para formar los grupos que fueron desafiados *in vitro* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño experimental. Grupos de animales *in vivo* y desafíos *in vitro*.

	GRUPO A	GRUPO B
<i>In vivo</i>	Ratones sanos (n=5)	Ratones infectados (n=5)
	Obtención de células peritoneales.	Obtención de células peritoneales 1 mes post infección.
<i>In vitro</i>	Controles: -Células sin estímulo -Células estimuladas con LPS/IFN- γ -Células estimuladas con IL-4 Desafíos: -Infección con espora viable -Infección con espora muerta por calor -Infección con espora inactivada en formol.	Controles: -Células sin estímulo -Células estimuladas con LPS/IFN- γ -Células estimuladas con IL-4 Desafíos: -Infección con espora viable -Infección con espora muerta por calor -Infección con espora inactivada en formol.

3.2.1. Tratamiento grupos A y B *in vivo*

Para ambos grupos el manejo se realizó el día 0. Mediante sujeción manual al grupo A le fue inoculado 0.3ml de PBS estéril por vía oral con la ayuda de un catéter Introcan, Certo de 24GX 3/4" (0.7mm x 19mm) como sonda. Para la infección del grupo B se utilizó la misma técnica de inoculación, se les dio la cantidad de 1×10^6 esporas de *E. cuniculi* por vía oral suspendidas en 0.3ml de PBS.

3.2.2. Detección de esporas en orina por el método de Calco flúor White

Se tomó muestra de orina a los animales de ambos grupos, para buscar la presencia de *E. cuniculi* y confirmar o descartar la infección sistémica. Se realizó una punción directa de vejiga con jeringas de 3ml (Terumo, Japón) y la orina fue colectada en tubos eppendorf (Eppendorf, Nueva York, EUA) los cuales fueron almacenados a 4°C. La detección de las esporas se hizo por medio de la tinción de Calco flúor White. Primeramente se realizó el frotis de la muestra en un portaobjetos (Velab) y se fijaron las muestras con metanol absoluto (Fisher Scientific), el cual se le aplicó con una pipeta Pasteur (Thermo Fisher), después se cubrió la muestra con Calco flúor White M2R (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich, EUA), dejándose incubar las muestras teñidas durante 15 min y después se lavaron con agua destilada y se dejaron secar, posteriormente las muestras teñidas fueron protegidas de la luz y una vez secas, se les colocó una gota de resina y se puso un cubreobjetos (Madesa, México). Por último, las laminillas fueron observadas bajo el objetivo 100X en un microscopio de fluorescencia (Leica, DM 1000).

3.3. Preparación del inóculo

Para la obtención de el inóculo de esporas de *E. cuniculi* viables usadas en la infección oral en ratones, así como las infecciones *in vitro*, fue necesaria la propagación de *E. cuniculi* en un cultivo celular de la línea Vero E6 (ATCC® CCL-81^{MR}), esto por la razón a la afinidad que tiene la espora -de *E. cuniculi*- hacia las células del riñón. (Joseph & Sharma, 2009). La línea celular Vero E6 (ATCC® CCL-81^{MR}), la cual estaba contenida

en un criovial (Corning, Nueva York, EUA), a -80°C , fue descongelada en baño María a 37°C . Luego, la suspensión celular se transfirió a un frasco de cultivo de 25cm^2 con filtro (Corning, Nueva York, EUA) con superficie de poliestireno tratada con nitrógeno que mejora la sujeción de las células, ya que las células Vero son dependientes de adherencia y no pueden crecer en medios de suspensión. Las células se mantuvieron en medio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA), atemperado a 37°C suplementado con 5% de suero fetal bovino inactivado (Corning, Nueva York, EUA), añadido con una solución de antibiótico y antimicótico (Sigma-Aldrich, Misuri, EUA). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C , con CO_2 al 5% y con una humedad del 95% en una incubadora Forma Series II Water Jacket (Thermo Fisher, Ohio, EUA), según la metodología revisada (Ammerman *et al.*, 2008). Todos los materiales utilizados estaban bajo condiciones de esterilidad y la manipulación de las células se realizó dentro de una campana de seguridad biológica CSB 120 (SEV Prendo aparatos de laboratorio, México). Una vez alcanzado el 55% al 60% de confluencia en una monocapa de células en los frascos de cultivo se agregó la cantidad de 6.0×10^6 esporas de *E. cuniculi* cepa (ATCC®50789^{MR}). Las células infectadas se mantuvieron en incubación bajo las condiciones ya mencionadas. El medio de cultivo RPMI 1640 fue cambiado cada 3 días y el sobrenadante fue colectado y almacenado a 4°C en tubos Falcon® fondo cónico de 50ml (Axygen Scientific, Nueva York, EUA). Se realizaron pases en un medio de tripsina al 0.25% (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos).

3.3.1. Obtención de esporas

Tres semanas post infección *in vitro* se observaron los cultivos celulares infectados en un invertoscopio (Primo Star Zeiss) bajo el objetivo de 40X y se identificaron vesículas parasitóforas siguiendo la recomendación de la literatura (González-Machorro *et al.*, 2019). Las células se desprendieron mediante un raspado (Corning, Nueva York, EUA,) y el contenido se colectó junto con los sobrenadantes almacenados previamente. Los tubos fueron centrifugados a 1750 rpm durante 10 min a 4°C (Universal 320R- Hettich Zentrifugen, Alemania). Se decantó el sobrenadante y el pellet celular fue resuspendido en 1ml de medio RPMI 1640 (Sigma Aldrich). Esta solución se pasó a través de una aguja

de un calibre de 27mm (Terumo, Tokio, Japón) hacia un tubo eppendorf de 1.5ml (Eppendorf, Nueva York, EUA). Este procedimiento se realizó tres veces con la intención de romper las células Vero y liberar las esporas viables. Posteriormente se realizó una segunda centrifugación en una microcentrífuga (Mikro 200R, Hettich Zentrifugen, Alemania) a 4000 rpm durante 20 min a 4°C y el sobrenadante se desechó para retirar los restos celulares. Finalmente, el contenido se suspendió en 1ml de medio RPMI 1640.

3.3.2. Conteo de esporas

La suspensión celular fue homogenizada en un Vórtex Mixer (Labnet, Nueva Jersey, EUA). Se depositaron 10µl de la solución de RPMI 1640 con esporas en un tubo de microcentrífuga de 0.5ml (Eppendorf, Nueva York, EUA). Se añadieron 190µl de medio de cultivo RPMI 1640 para tener una dilución de 1:200; de dicha dilución se tomaron 10µl, los cuales se depositaron en una cámara de Neubauer (Hausser Scientific, Pensilvania, EUA), la cual se cubrió con un cubreobjetos cuadrado (Madesa, México). Se observó en un microscopio Axiostar Plus (Carl Zeiss, Gotinga, Alemania) bajo el objetivo de 100X para el conteo. Se tomaron cinco cuadrículas pequeñas del centro que son comúnmente utilizadas para el conteo de eritrocitos (Figura 5).

La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$\text{Número de esporas} = (\text{Promedio de esporas de 5 cuadros centrales}) \times (0.25) \times (\text{FD}) \times (1,000,000)$$

Donde el FD corresponde al factor de dilución, que se determina dividiendo el volumen final de la muestra (VF) entre el volumen inicial (VI). FD fue de 20. Se realizaron alícuotas de 10×10^6 de esporas en 1ml de medio RPMI y fueron almacenadas a 4°C hasta su uso posterior.

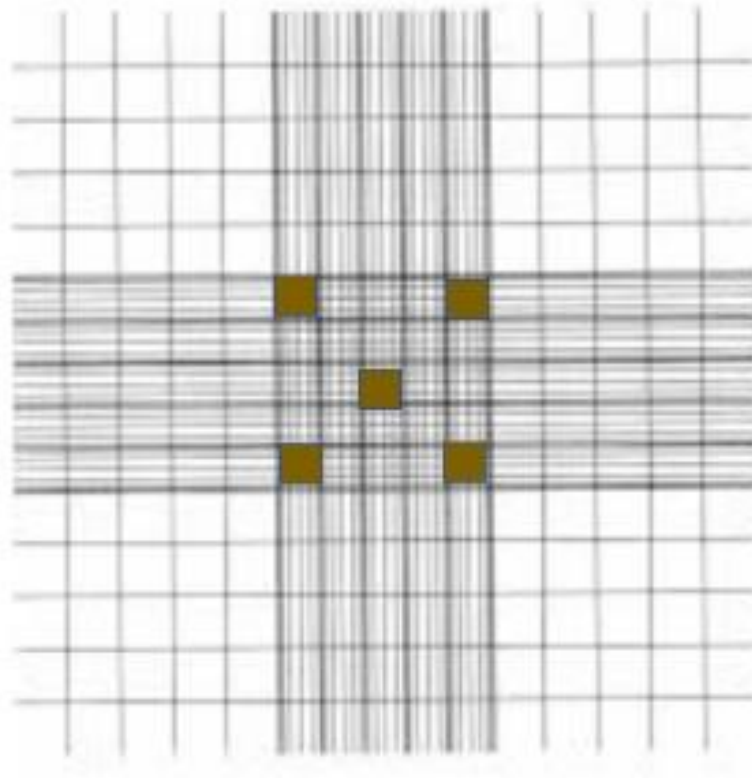


Figura 5. Visualización de cámara de Neubauer. Resaltado las cuadrículas utilizadas para el conteo de esporas.

3.3.3. Obtención de las variedades antigénicas de la espora

3.3.3.1. Esporas muertas por calor

Se tomó una alícuota de las esporas previamente contabilizadas y almacenadas, y con la ayuda de un bloque térmico AccuBlock^{MR} Digital Dry Bath (Labnet International, Nueva Jersey, EUA) se expusieron a calor constante de 90°C, durante 30 min. Finalmente, las esporas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso para los tratamientos antes mencionados.

3.3.3.2. Esporas inactivadas por formalina

Se tomó una alícuota de las esporas que fueron previamente contabilizadas y almacenadas. La suspensión fue depositada en un tubo Falcon de 15ml y se centrifugó a 1500 x g durante 10 min a 4 °C en (Universal 320R). Se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 1ml de formalina al 10%, dejando el solvente durante 30 minutos para su fijación y el contenido fue pasado a un tubo eppendorf de microcentrífuga para pasar por una segunda centrifugación en Mikro 200R (Hettich Zentrifugen, Alemania), bajo las mismas condiciones. Se descartó la formalina como sobrenadante y el pellet fue re suspendido en medio de cultivo RPMI 1640, se repitió el paso por centrifuga. Las esporas fueron almacenadas a 4°C hasta su uso posterior en los tratamientos.

3.4. Cultivo primario a partir de células peritoneales

3.4.1. Anestesia y sacrificio

Los animales fueron anestesiados a una dosis 7.5mg/kg con el disociativo (Zoletil® 50, Virbac) vía intramuscular (IM). Una vez en anestesia profunda se sacrificaron mediante la dislocación cervical de acuerdo con la Norma Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

3.4.2. Lavados peritoneales

A los ratones se les administró por vía intraperitoneal 0.5ml de medio de cultivo RPMI 1640, después de 30 min se procedió a su sacrificio. Posteriormente, cada ratón fue rociado con alcohol al 70% para su esterilización y después se fijó a una base de poliestireno para disección. Este procedimiento se realizó en un ambiente de esterilidad para lo cual se utilizaron dos mecheros, uno a cada lado del animal. Se realizó la disección de la piel abdominal para exponer el peritoneo y con la ayuda de un catéter de 24G (Introcan Certo) y una jeringa de 5ml se inyectaron 5ml adicionales de medio RPMI y se realizó un leve masaje en el área peritoneal para despegar las células peritoneales. El contenido fue extraído por medio de la misma jeringa y se depositó en un tubo Falcon de 50ml, el cual fue mantenido en hielo para evitar la adhesión celular. Este procedimiento se realizó dos veces en cada ratón. Finalmente, se realizó un pool celular con lo recolectado de los cinco ratones tanto del grupo A, como del grupo B (50ml por cada grupo de ratones). Una vez terminada la colección del contenido peritoneal se valoró la viabilidad de las células mediante la exclusión con Azul de Tripano al 0.4% (Corning) (>95%) y se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer, contando los cuatro cuadros de las orillas (Figura 6).

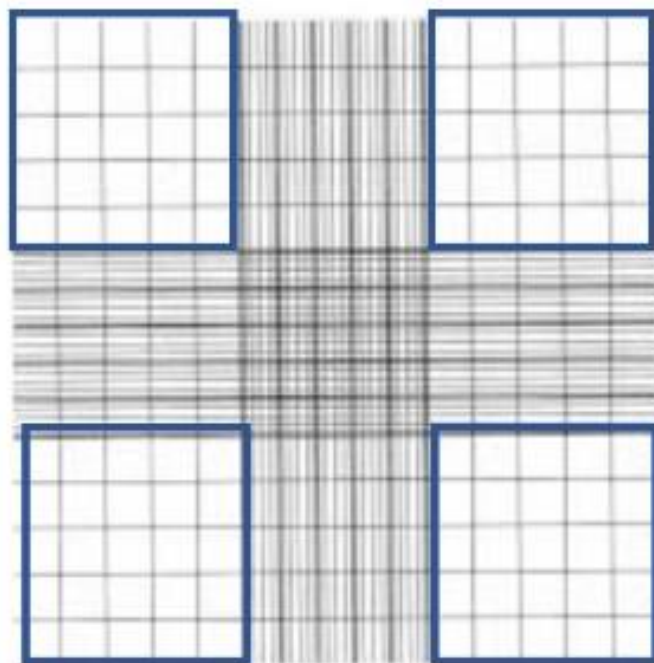


Figura 6. Cuadros utilizados para el conteo celular en cámara de Neubauer marcados en azul.

3.4.3. Cultivo de Macrófagos Peritoneales

Las células peritoneales de cada grupo fueron sembradas en cinco microcámaras (Lab-Tek 154941). Cada microcámara consta de ocho micro pozos, se usaron 5×10^5 células por pozo. El resto fueron distribuidas en seis frascos de cultivo de 25cm^2 (Corning, Nueva York, EUA) a razón de 1×10^6 células por frasco. Los cultivos se mantuvieron en $300\mu\text{l}$ y 4ml de medio RPMI suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS Gibco, USA), 1 mM L-glutamina (Sigma) y estreptomycin (200 mg/ml), penicilina G (Sigma) y en incubación a 37°C , en 5% de CO_2 . A las 24 h las cámaras y frascos de cultivo fueron lavados con PBS estéril para retirar las células no adherentes.

3.5. Estímulos y desafíos *in vitro*

3.5.1. Activación de macrófagos *in vitro*

Una vez que las células peritoneales se adhirieron a las cámaras y a los frascos de cultivo, fueron tratadas para obtener los controles positivos de los macrófagos tipo M1 y M2. Las células se estimularon experimentalmente por separado bajo las siguientes condiciones: un grupo de células *in vitro* no recibió estímulo, solo se realizó un cambio al medio, el grupo de células positivo para M1 se estimuló con LPS (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli*, Sigma, L2630) a razón de 100ng/ml e $\text{INF-}\gamma$ (Mouse interferon gamma, Bio World, 507586), 20ng/ml durante 24 h y finalmente, el grupo de células positivo para M2 fue estimulado con IL-4 (AB9729, abcam), a razón de 20 ng/ml durante 24 horas, de acuerdo a la literatura (Cuadro 2) (Martinez *et al.*, 2006). Los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones de incubación a 37°C , en 5% de CO_2 y 95% de humedad. Al finalizar el tiempo de estimulación las células en las microcámaras fueron fijadas a las laminillas, mientras que las células de los frascos de cultivo fueron colectadas y el sobrenadante de todos los cultivos se almacenó a 4°C para su posterior utilización.

3.5.2. Infección de macrófagos *in vitro*

Se formaron tres grupos para los desafíos que consistieron en grupo T1 infección con esporas viables, grupo T2 infección con esporas muertas por calor y grupo T3 infección con esporas inactivadas en formol (Cuadro 3). La cantidad de esporas agregadas a los cultivos fue a razón de 10:1 (10 esporas por 1 célula) (González-Machorro *et al.*, 2019). El tiempo de infección fue de 3 días y los cultivos fueron analizados bajo el microscopio a diario para comprobar internalización de la espora a las células. Los cultivos infectados se mantuvieron en condiciones de incubación a 37°C, en 5% de CO₂. Al finalizar el tiempo de infección las células en las microcámaras fueron fijadas a las laminillas, las células de los frascos de cultivo fueron colectadas y el sobrenadante fue almacenado todo para su posterior procesamiento.

Cuadro 3. Distribución de los tratamientos para las células peritoneales obtenidas.

CONTROLES	T1	T2	T3
-Sin estímulo -100ng/ml LPS y 20ng/ml INF- γ por 24hrs. -20ng/ml IL-4 por 24hrs.	Esporas viables.	Esporas muertas por calor.	Esporas inactivadas en formol.

3.6. Caracterización de macrófagos M1 y M2

3.6.1. Inmunofluorescencia

Al terminar el tiempo de estímulo con las citocinas y el tiempo de tratamientos con la espora, el sobrenadante fue retirado y almacenado en congelación para detectar NO mediante la reacción de Griess. Se realizaron 2 lavados con PBS a las células peritoneales, las cuales se fijaron a las microcámaras con metanol durante 20 min a 4°C. Luego se removió el fijador y se realizaron dos lavados con PBS 1X, Tritón X-100 0.1% de 5 min cada uno para permeabilizar las células. El bloqueo de los sitios de unión inespecíficos se realizó con suero de caballo al 10% en PBS 1X, Tritón X-100 0.1% y se dejó en incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se removió la solución de bloqueo y se adicionaron los anticuerpos (Ac) primarios anti-iNOS (ab210823, abcam) y anti-Arg-1 (ab91279, abcam), los cuales fueron previamente diluidos 1:250 y 1:200 respectivamente en Antibody Diluent (ab64211, abcam). Se dejó una incubación de toda la noche a 4°C. Al día siguiente se recuperó el Ac primario y se realizaron dos lavados con PBS 1X Tritón X-100 0.1% de 5 minutos cada uno. Se agregaron los Ac secundarios anti-Ratón Alexa Flúor 488® (ab150117, abcam) y anti-conejo Alexa Flúor 594® (ab150088, abcam) previamente diluidos 1:1000 en Antibody Diluent (ab64211, abcam). La incubación se realizó por 2 h a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizaron dos lavados con PBS de 5 min protegiendo la microcámara de la luz y posteriormente se desmontó. Para la contra tinción de los núcleos y la fijación del cubre objetos se colocó 1 gota del medio de montaje Vectashield Antifade Mounting Medium with DAPI (abcam) sobre cada uno de los cuadros. Las laminillas fueron almacenadas a 4°C en la oscuridad hasta el momento de su análisis.

3.6.1.1. Análisis de las laminillas

Las laminillas fueron observadas al día siguiente en un microscopio de fluorescencia (Leica, DM 1000) bajo el objetivo 40X con los tres filtros. Las fotografías fueron tomadas con el programa Q imaging Micro Publisher 5.0 RTV. Se tomaron ocho fotografías con cada filtro a la misma exposición (10 s) por micro pozo, procurando una distribución similar en el número de células (100 células en total). Finalmente, estas imágenes fueron

evaluadas con la ayuda del programa Image J para medir la intensidad de fluorescencia, utilizando el mismo límite de detección para cada señal. Esta señal fue cuantificada y graficada como intensidad de fluorescencia media (MFI).

3.6.2. Medición de nitritos en sobrenadante

Se utilizó el kit de detección Griess Reagent System (Promega). Se preparó la solución estándar proporcionada por el kit de 1:1000 en donde se mezcló 1µl de la solución del kit de 100µM con 999µl de la matriz (medio RPMI 1640). La manera en que se distribuyeron las soluciones en una placa de 96 pozos (Nest Biotechnology) fue de la siguiente manera, para realizar diluciones seriadas: en la fila A se agregaron 100µl de la solución estándar y en las siguientes tres columnas (filas B-H), se depositaron 50µl de medio RPMI 1640, para obtener la curva de referencia. Se colocaron 50µl de las muestras de sobrenadante para analizar por triplicado en los micro pozos continuos, con la pipeta multicanal se agregó 50µl de la solución del kit Sulfanilamida y se realizó una incubación de 10 min a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz. Después de la incubación se agregaron 50µl de la solución Diclorhidrato de N-1-naftiletilendiamina (NED) del kit a cada muestra y se realizó una segunda incubación de 10 min a TA en la oscuridad. Los resultados fueron tomados antes de que transcurrieran más de 30 min desde la incubación, en un lector de micro plato (Bio-Rad iMark) a una absorbancia de 540 nm. Para generar la curva de referencia se trazó el valor de la absorbancia promedio de cada concentración del estándar de nitrito en función de Y con concentración del nitrito en función de X. Se determinó el valor promedio de absorbancia de cada muestra experimental y se determinó la concentración en comparación con la curva de referencia.

3.6.3. Ensayo de medición de actividad de Arginasa

Se recuperaron las células de los frascos de cultivo 25cm² (1X10⁶) en un tubo eppendorf despegándolas por medio de tripsina, se centrifugaron a 1000g durante 10 min a 4°C. Las células fueron lisadas en 100 µl de tritón X-100 durante 10 min. La muestra pasó por otra centrifuga de 13,000 g por 10 min para remover el material insoluble. Se colocaron 40 µl del sobrenadante a una placa de 96 pozos y se agregó también 40 µl del blanco (PBS) y 40 µl de agua. Se agregó 50 µl del estándar de urea previamente preparado (se diluyeron

24 µl de la solución de 50 mg/dL de urea en 176 µl de agua para tener la preparación de 1mM solución estándar). Se preparó el 5x buffer de sustrato a las siguientes proporciones por muestra:

Se agregó 10µl de esta solución solamente a las muestras y se incubó a 37°C durante dos horas. El reactivo de urea se preparó de la siguiente manera:

Reactivo	Volumen
Buffer de arginina	8µl
Solución Mn	2µl

Reactivo	Volumen
Reactivo A	100µl
Reactivo B	100µl

Para detener la reacción de la arginasa se agregaron 200µl del reactivo de urea a todos los pozos (muestras, agua, blanco y urea estándar) y después se agregaron 10µl del buffer de sustrato a los blancos. La placa se incubó durante 60 min a temperatura ambiente y la absorbancia fue medida en un lector de micro plato (Bio-Rad) a 430nm. Se utilizó la siguiente ecuación para determinar la actividad de la arginasa:

$$\text{Actividad} = \frac{(A430)_{\text{muestra}} - (A430)_{\text{blanco}}}{(A430)_{\text{estándar}} - (A430)_{\text{agua}}} \times \frac{(1\text{mM} \times 50 \times 10^3)}{(V \times T)}$$

Donde:

T= tiempo de la reacción en minutos.

V= volumen de muestra (µ) agregado al pocillo

1mM= concentración del estándar de urea

50= volumen de reacción (µ)

10³= factor de conversión de mM a µ.

3.7. Análisis estadístico

Los datos se clasificaron mediante una prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Para los datos que no seguían los criterios de normalidad, como la cuantificación de la señal para las inmunofluorescencias MFI, se utilizó el método de Kruskal-Wallis. Los datos que mostraron diferencia significativa se les realizó las pruebas post hoc. Para hacer las comparaciones entre grupos y el análisis de la actividad de la arginasa se utilizó la prueba de Mann-Whitney. Y para los datos en la concentración de nitritos que si tenían una distribución normal se utilizó la t-Student. Para todos los métodos se utilizó el software SPSS Statistics 25.

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de esporas viables

Las esporas de *E. cuniculi* tuvieron una adecuada replicación en la línea celular Vero E6. En la mayoría de las células cultivadas (95-100%) se encontraron múltiples quistes parasitarios. Después de su recolección, las esporas fueron contabilizadas, colectándose un total de 130×10^6 de esporas, las cuales fueron obtenidas de los 8 frascos de cultivo de células Vero E6 25 cm^2 (Figuras 7 y 8).

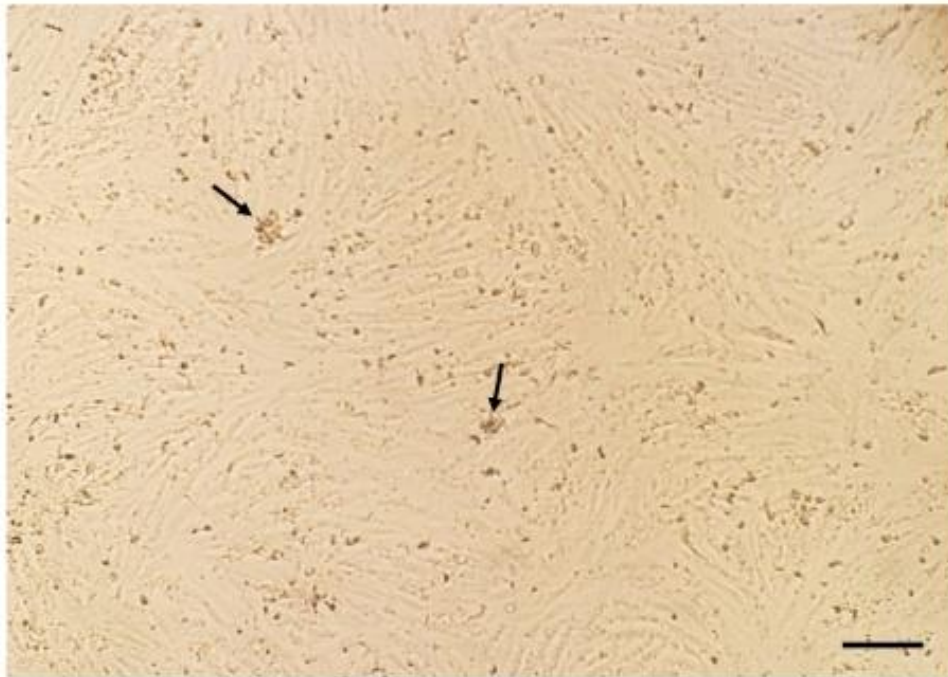


Figura 7. Cultivo de células Vero con una confluencia del 100%. Infección con la espora de *E. cuniculi* (10:1). Células Vero con esporas en su interior (flecha). Invertoscopio 20X (Zeiss). Barra=100 μm .



Figura 8. Célula Vero infectada con numerosas esporas maduras de *E. cuniculi* (flecha) y merontes (cabeza de flecha). Microscopio de luz 100X. Barra=20 μ m.

4.2. Modelo de infección murino

Con la tinción de Calcoflúor White no se encontraron esporas fluorescentes en las muestras de orina del grupo de ratones A, considerando todas las muestras de este grupo negativas a *E. cuniculi* (Figura 9). En contraste, en las muestras de orina del grupo B a los 30 días post infección si se lograron detectar esporas de *E. cuniculi*, sugiriendo una infección sistémica. Esta tinción, reveló estructuras fluorescentes redondas u ovales, de aproximadamente 2mm de diámetro, de color azul turquesa pálido en todas las muestras de orina de los ratones del grupo B (Figura 10).



Figura 9. Muestra de orina de ratones grupo A. Tinción con Calcoflúor White. Muestra negativa; no se encontraron esporas en la orina de los ratones. Microscopio de fluorescencia 100X. Barra=5µm.



Figura 10. Muestra de orina de ratones grupo B. Tinción con Calcoflúor White. Muestra positiva; se observan las esporas fluorescentes. Microscopio de fluorescencia 100X. Barra= 5 μ m.

4.3. Extracción y cultivo de células peritoneales

Se recolectó una cantidad suficiente de aproximadamente 5×10^6 de células mononucleares en los lavados de peritoneo de cada ratón. Se realizó un pool de la suspensión celular obtenida, la cual se contabilizó y se obtuvo una cantidad total de 26×10^6 células del grupo A y un total de 24×10^6 células del grupo B. Posteriormente, las células se repartieron de manera equitativa para los diferentes protocolos.

Para la inmunofluorescencia, en la microcámara se utilizaron 5×10^4 células por pozo y 3.5×10^6 de células por frasco de cultivo de 25cm^2 para cada tratamiento. Se dejaron incubar para obtener solamente células adherentes, las cuales representaron el 30% de la población de células peritoneales. Al día siguiente, después de los lavados con PBS, en las microcámaras quedaron adheridas 1.5×10^3 células y en los frascos de cultivo 1.05×10^6 células (Figura 11).

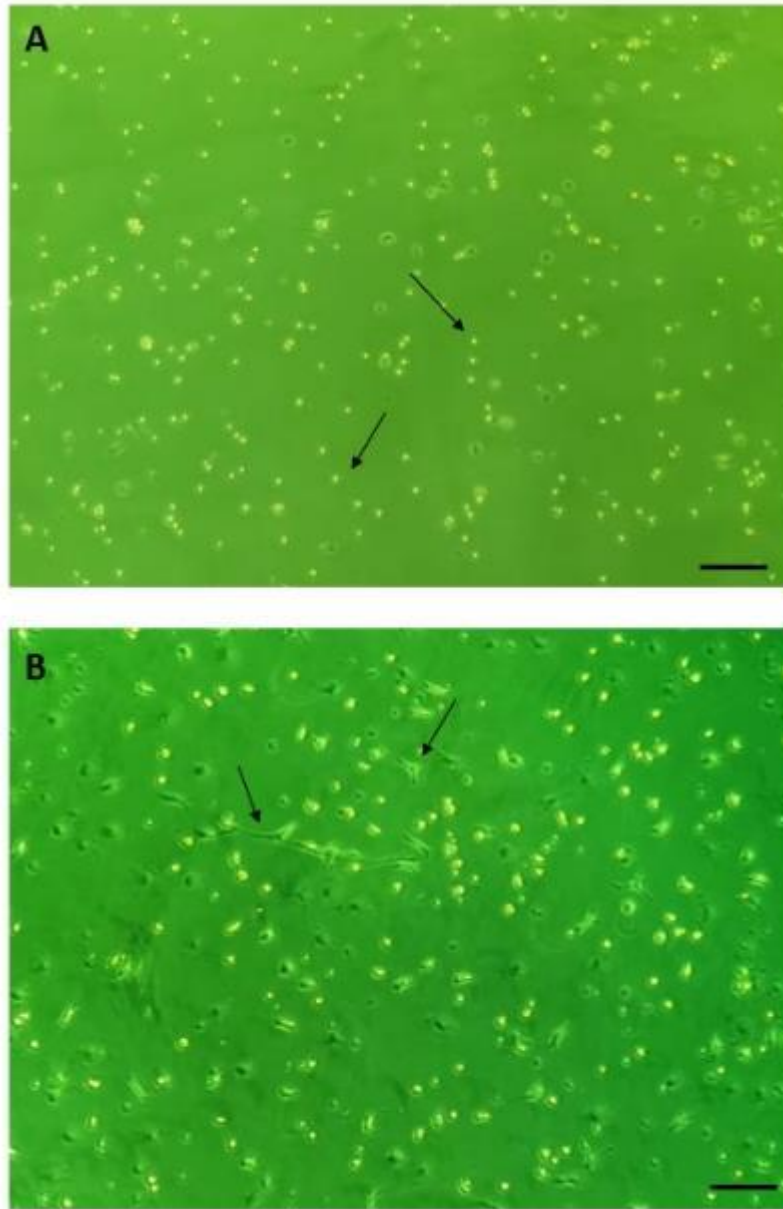


Figura 11.- Cultivo primario de células extraídas de lavados peritoneales de ratones Balb/c. A. Células peritoneales sin adherir (flechas), se encuentran suspendidas en el medio de cultivo y presentan una morfología redondeada. B. Células peritoneales adheridas (flechas), después de 24 horas de cultivo, en su mayoría macrófagos. Se encuentran unidas a la base del frasco de cultivo y tienen morfología extendida. Invertoscopio 20x. Barras= 100 μ m.

4.3.1. Identificación de macrófagos

La identificación de los macrófagos peritoneales (células adherentes) se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. Se utilizó un Ac dirigido a un marcador específico de macrófagos anti- S100A8/9 y el resultado obtenido fue que el 100% de las células presentes en los cultivos después de la adhesión eran macrófagos (Figura 12).

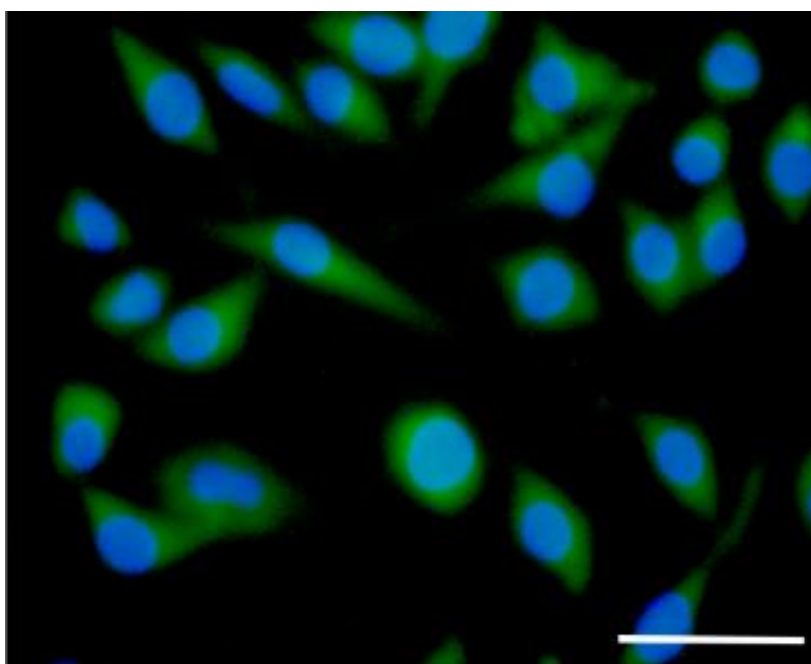


Figura 12. Inmunomarcaje de células peritoneales. La señal en verde corresponde al complejo S100A8/9 específico para macrófagos. En azul los núcleos de las células teñidos con DAPI. Microscopio de fluorescencia 40X. Barra= 20µm.

4.4. Controles positivos de células M1 y M2

4.4.1. Estímulos *in vitro*

Para la obtención de los controles positivos para células M1 productoras de NO, se utilizó el estímulo *in vitro* de 20ng/ml de LPS en combinación con 100ng de IFN- γ , (LPS por sí solo no fue capaz de estimular las células extraídas de ratones Balb/c. La combinación tanto de LPS como IFN-g resultó en una sinergia entre estos estímulos pro-inflamatorios (Feito *et al.*, 2019). Para las células M2 se utilizaron 20ng de IL-4, estímulo suficiente para obtener células productoras de Arg-1. A las 24 h se identificó la polarización de los macrófagos peritoneales de ratones Balb/c (Figura 13).

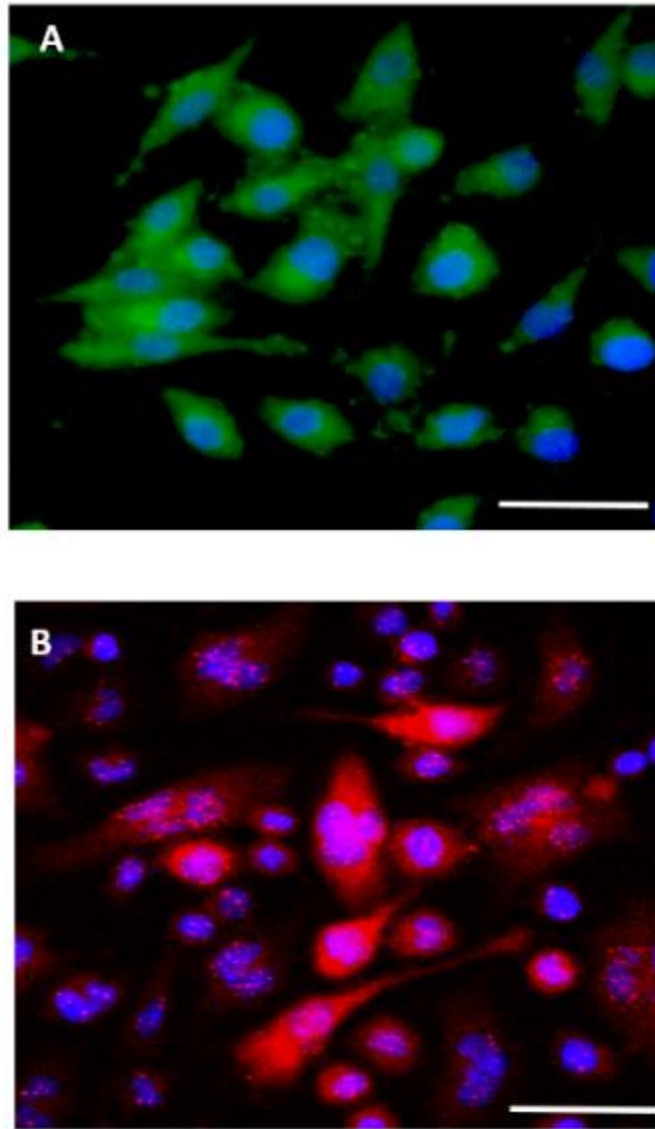


Figura 13. Inmunofluorescencia de los controles positivos de las células M1 y M2. Células peritoneales de ratones Balb/c. A. Células peritoneales estimuladas *in vitro* con LPS/INF- γ por 24 horas e inmunomarcadas con Ac primario anti-iNOS ratón y Ac secundario anti-ratón Alexa 488[®]. B. Células estimuladas *in vitro* con IL-4 e inmunomarcadas con Ac. Primario anti-Arg-I y Ac secundario anti-conejo Alexa 594[®]. Azul= núcleos de las células teñidos con DAPI, verde= señal positiva para la enzima iNOS, rojo= señal positiva para la enzima Arg-I. Barra=20 μ m.

4.4.2. Controles positivos grupo A

Las células peritoneales de los ratones Balb/c del grupo A sin estímulo *in vitro* tuvieron una producción de Arg-1 mayor (25 MFI) que la de iNOS (15 MFI); sin embargo, no hubo una diferencia significativa ($p>0.05$) entre ambos grupos de células.

Las células peritoneales del grupo A estimuladas *in vitro* con la combinación de LPS e INF-g presentaron una producción mayor de iNOS (25 MFI) cuando se compararon con las células que generaron una respuesta tipo Arg-1 (3 MFI), lo cual fue significativamente diferente ($p<0.001$). Finalmente, las células peritoneales estimuladas *in vitro* con la citocina antiinflamatoria IL-4 tuvieron una producción mayor de Arg-1 (22 MFI) que las células que expresaron iNOS (2 MFI), siendo esta diferencia significativa ($p<0.001$). No obstante, la producción de Arg-1 de las células estimuladas con IL-4 fue menor que las células que no recibieron ningún estímulo. Con respecto a la comparación entre grupos A y B la producción de iNOS mostró diferencia significativa ($p=0.011$), lo contrario con la producción de Arg-1.

4.4.3. Controles positivos grupo B

Las células peritoneales de los ratones Balb/c del grupo B infectadas *in vivo*, pero sin estímulo *in vitro* generaron mayor cantidad de Arg-1 (35 MFI) en comparación con las que produjeron iNOS (25 MFI); no obstante, no se apreció ninguna diferencia estadística entre ambos grupos de células ($p>0.05$).

Las células peritoneales del grupo B estimuladas *in vitro* con LPS e INF-g mostraron una mayor producción ($p<0.001$) de iNOS (52 MFI) cuando se compararon con las células peritoneales que produjeron Arg-1 (9 MFI). Las células peritoneales estimuladas *in vitro* con IL-4 tuvieron una producción mayor ($p<0.001$) de Arg-1 (31 MFI) que las células que expresaron iNOS (11 MFI). Al igual que en el grupo A, la producción de iNOS en las células estimuladas con IL-4 no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) cuando se comparó con su mismo control negativo. Con respecto a la comparación entre grupos A y B, la producción de iNOS mostró una diferencia significativa ($p=0.011$), en contraste con lo esperado para Arg-1 (Figura 14).

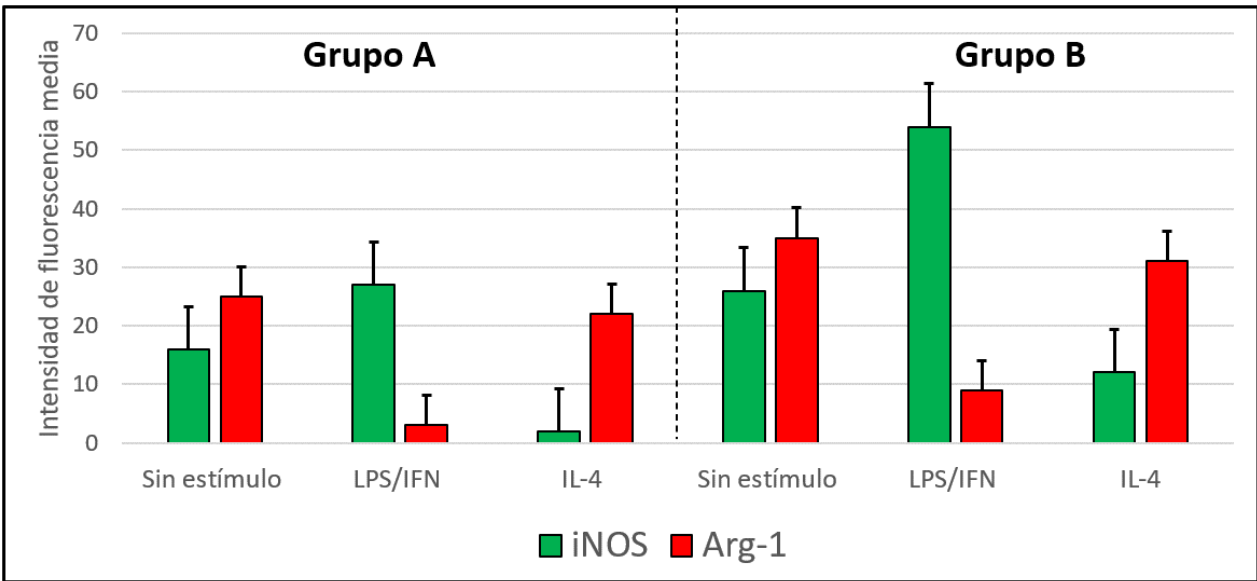


Figura 14. Cuantificación de la señal de fluorescencia como intensidad de fluorescencia media (MFI) para las células peritoneales de ambos grupos experimentales. Diferencia significativa en la relación entre iNOS y Arg-1 en los tratamientos LPS/INF- γ de ambos grupos y en el tratamiento con IL-4 del grupo A. Diferencia significativa en la producción de iNOS entre grupos ($p < 0.05$).

4.5. Infecciones *in vitro*.

A las 72 h post infección *in vitro*, se observaron en un invertoscopio los cultivos de las células peritoneales desafiadas con las esporas vivas, con las esporas muertas por calor y con las esporas inactivadas con formol y se apreció que la mayoría de las células (90%) contenían esporas en su interior (Figura 15).

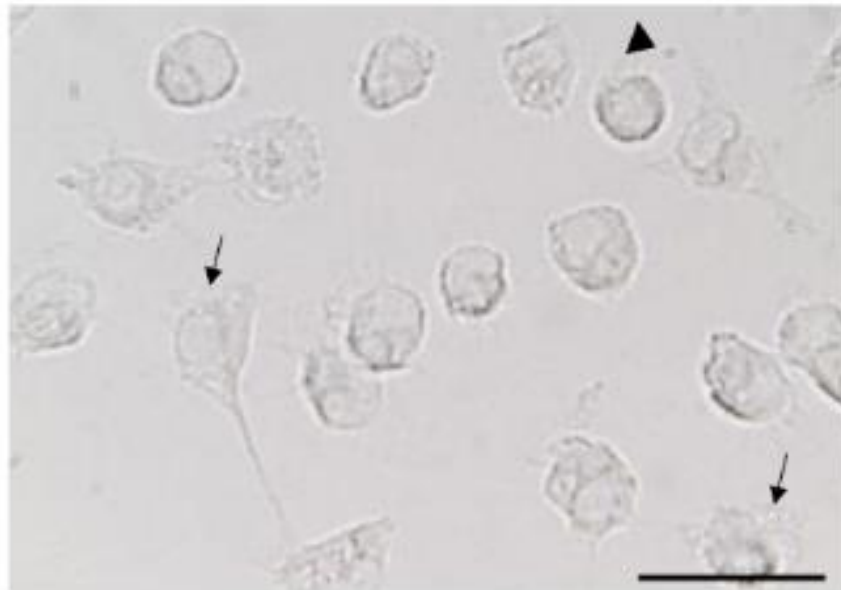


Figura 15. Macrófagos peritoneales a los 3 días post infección con esporas viables de *E. cuniculi*. Se aprecian escasas esporas en el exterior de las células (cabeza de flecha), mientras que la mayoría se observaron en el citoplasma celular (flecha). Microscopio de luz 100X. Barra=20µm.

4.6. Inmunofluorescencia indirecta

Se confirmó la presencia de las enzimas iNOS y Arg-1 en los macrófagos peritoneales de los ratones de ambos grupos. La detección se hizo de manera visual con la ayuda de un microscopio de fluorescencia, se tomaron fotografías bajo tres filtros (549nm, 488nm y 350nm) y después se realizó un “merge” (superposición) del mismo plano con las tres imágenes con el programa Image J.

4.6.1. Grupo A

En las células que no fueron estimuladas del grupo A, se observó una señal positiva para Arg-1 y muy poco detectable para iNOS, indicando que la mayoría de las células se encuentran como M2 o inactivas. La morfología de las células fue extendida, algunas se encontraban alargadas o fusiformes y con un alto grado de adherencia (Figura 16, A).

En las células de los animales del grupo A que fueron desafiadas *in vitro* con esporas vivas de *E. cuniculi* se observó la expresión tanto de iNOS, como de células positivas a Arg-1, manteniéndose un balance entre M1 y M2. La morfología de las células observadas fue redondeada (Figura 16 B).

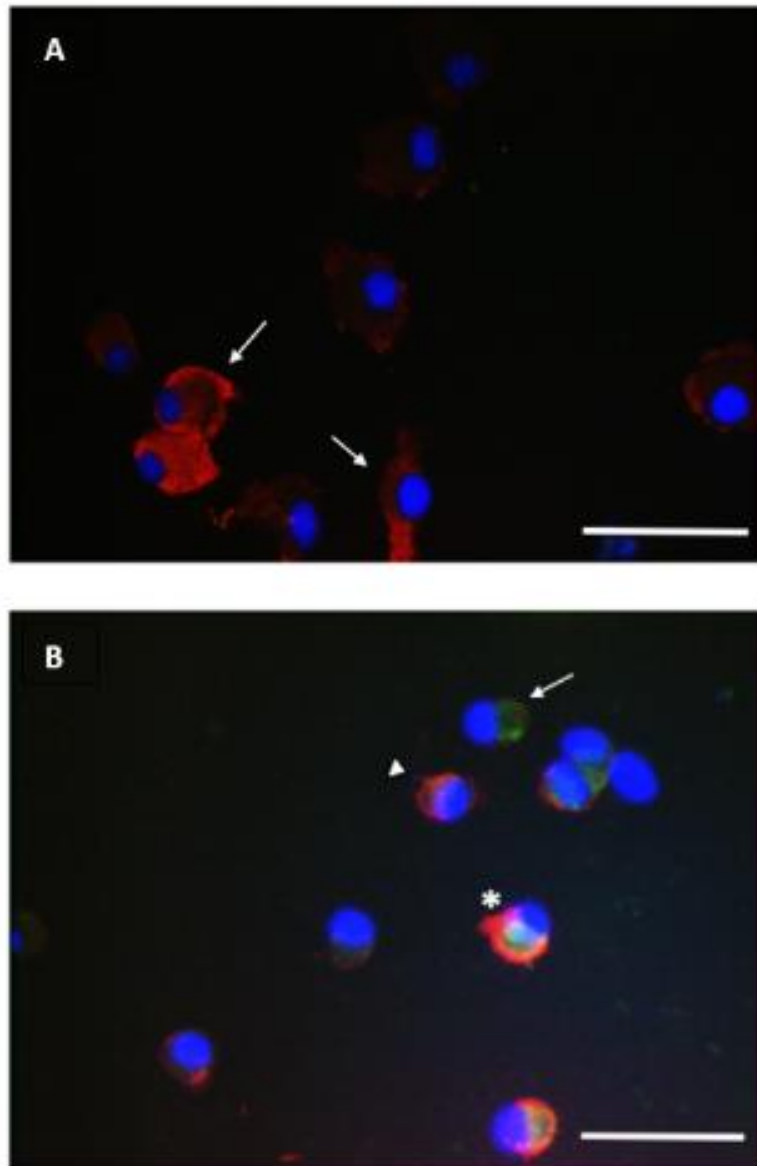


Figura 16. A. Superposición de los resultados de la inmunofluorescencia indirecta de las células peritoneales recolectadas de los ratones del grupo A, células sin estímulo *in vitro*. Célula positiva M2 (flecha). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20 μ m. B. Inmunofluorescencia indirecta de las células peritoneales recolectadas de ratones del grupo A animales sanos, células infectadas *in vitro* con esporas viables. Célula M1 positiva a iNOS (flecha), célula M2 positiva a Arg-1 (cabeza de flecha). Célula positiva a ambos fenotipos (asterisco). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1, verde= enzima iNOS. Microscopio de luz UV 20x. Barra=20 μ m.

En las células del grupo A desafiadas *in vitro* con esporas muertas por calor se observó mayormente una señal positiva a iNOS, es decir, a células M1. Se apreciaron pocas células positivas a Arg-1, células M2, y en escasas células se observó un marcaje doble hacia M1 y M2. La morfología de las células se distinguió redondeada (Figura 17).

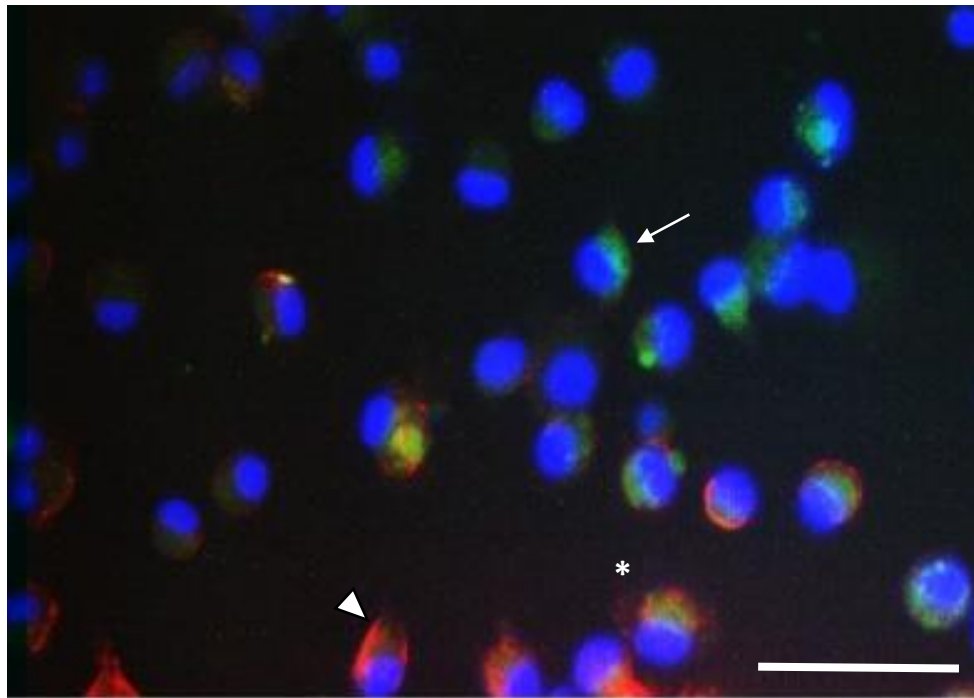


Figura 17. Inmunofluorescencia indirecta de células peritoneales recolectadas del grupo A desafiadas *in vitro* con esporas de *E. cuniculi* muertas por calor. Células M1 positivas a iNOS (flecha), células M2 positivas a Arg-1 (cabeza de flecha), células positivas a iNOS y Arg-1 (asterisco). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1, verde= enzima iNOS. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20µm.

Las células infectadas *in vitro* con esporas inactivadas con formol del grupo A presentaron mayormente una señal positiva para iNOS, macrófagos activados M1. Fue difícil identificar a los macrófagos con señal positiva para Arg-1. Asimismo, se identificaron escasas células positivas a ambas enzimas (Figura 18).

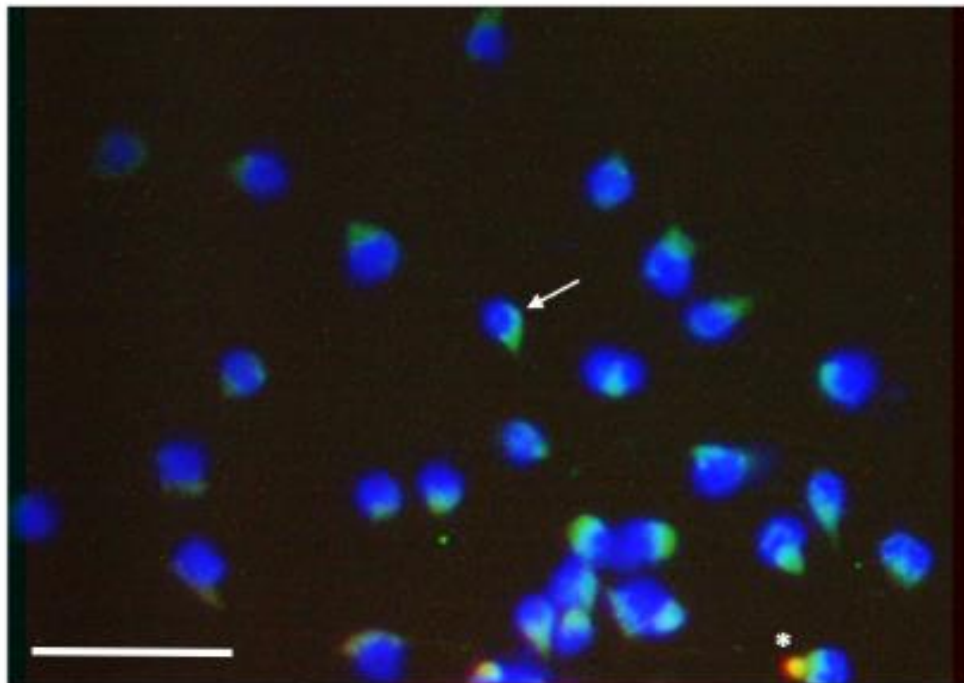


Figura 18. Inmunofluorescencia indirecta de células peritoneales recolectadas del grupo A desafiadas *in vitro* con esporas de *E. cuniculi* que fueron inactivadas por formol. Células M1 positivas a iNOS (flecha), células positivas a iNOS y Arg-1 (asterisco). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1, verde= enzima iNOS. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20µm.

4.6.2. Grupo B

En las células sin estimular del grupo B se observó mayormente una señal positiva para Arg-1, indicando que la mayoría de las células fueron identificadas como macrófagos M2. En contraste, se observó una escasa señal para iNOS. La morfología de las células fue notoriamente fusiforme (Figura 19).

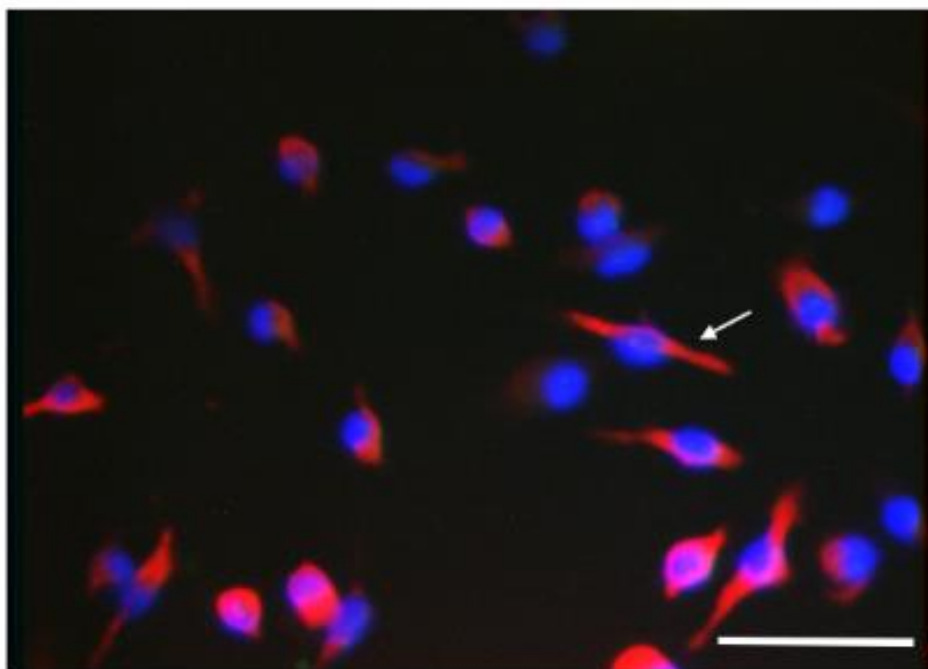


Figura 19. Superposición de inmunofluorescencia indirecta de las células peritoneales recolectadas del grupo B. Células sin estímulo previo *in vitro*. Señal positiva Arg-1 (flecha). Azul= núcleo de la célula. Rojo=enzima Arg-1. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20 μ m.

Células de animales del grupo B que fueron infectadas *in vitro* con esporas viables de *E. cuniculi*. Se observó señal positiva para ambas enzimas., Al momento de medir la intensidad de fluorescencia se determinó que la mayor señal fue para iNOS. Células con morfología redondeada (Figura 20).

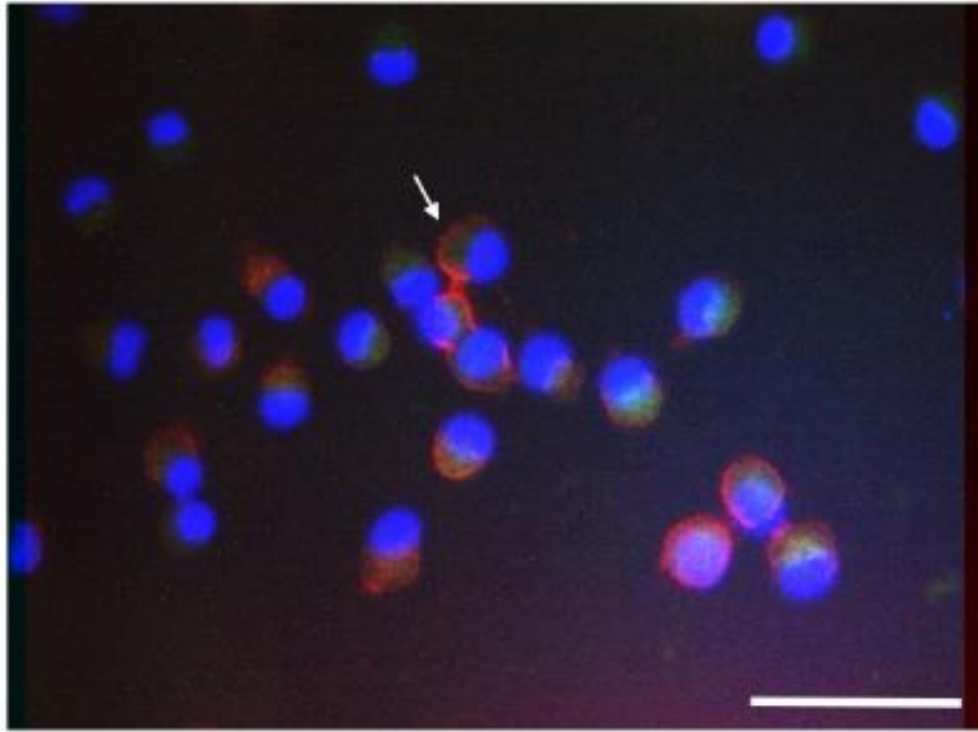


Figura 20. Superposición de Inmunofluorescencia indirecta de las células peritoneales recolectadas del grupo B animales infectados *in vivo* con *E. cuniculi*, células desafiadas *in vitro* con la espora viable de *E. cuniculi*. Señal positiva para ambas enzimas (flecha). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1, verde= enzima iNOS. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20 μ m.

En las células de animales del grupo B desafiadas *in vitro* con esporas de *E. cuniculi* muertas por calor se detectaron ambas señales. Aunque se observó una mayor positividad en su citoplasma para iNOS, el marcaje para Arg-1 se localizó cercano a la membrana celular. Morfología de células variable, algunas redondas otras se muestran expandidas y algunas alargadas (Figura 21).

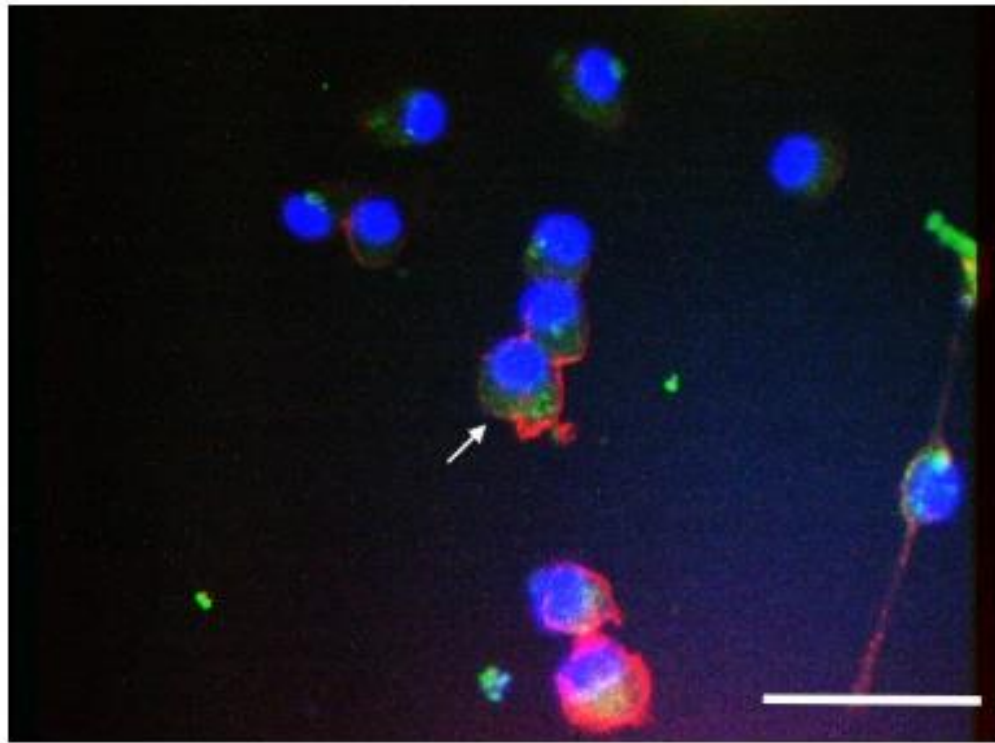


Figura 21. Superposición de inmunofluorescencia indirecta de las células peritoneales recolectadas del grupo B, animales previamente infectados con *E. cuniculi*. Células desafiadas *in vitro* con la espora de *E. cuniculi* muerta por calor. Señal positiva para ambas enzimas (flecha). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1, verde= enzima iNOS. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20µm.

En las células de animales del grupo B que fueron desafiadas *in vitro* con esporas de *E. cuniculi* inactivadas en formol se detectó una mayormente señal positiva para iNOS, células M1. Se observaron escasas células que mostraban positividad a ambas señales. La morfología de las células era redondeada (Figura 22).

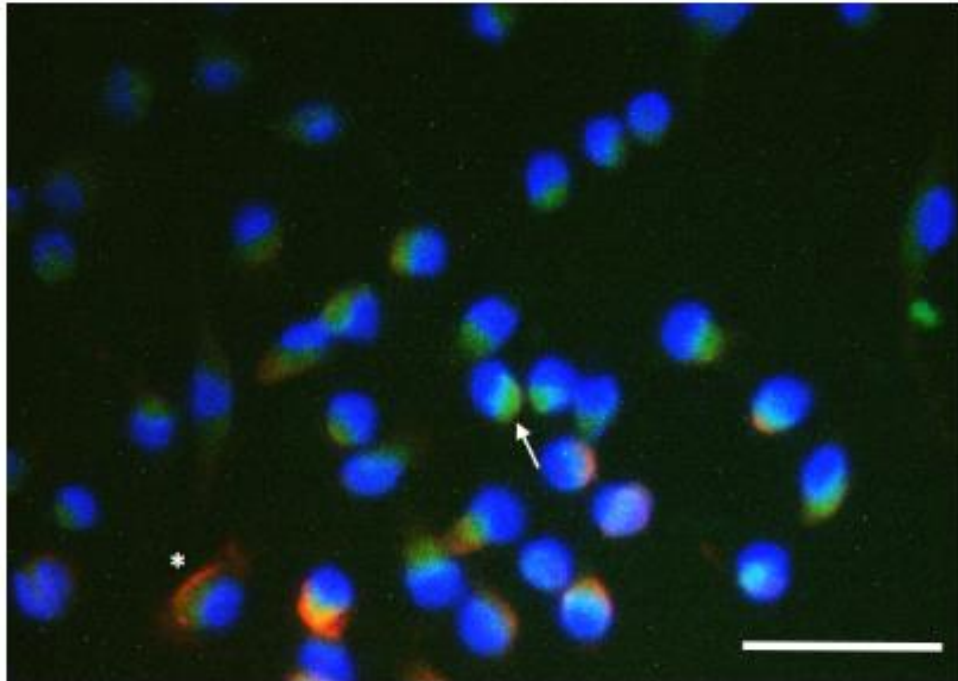


Figura 22. Superposición de Inmunofluorescencia indirecta de las células peritoneales recolectadas del grupo B animales previamente infectados con *E. cuniculi*. Células desafiadas *in vitro* con la espora de *E. cuniculi* inactivada en formol. Señal positiva para ambas iNOS (flecha), señal positiva para ambas enzimas (asterisco). Azul= núcleo de la célula. rojo= enzima Arg-1, verde= enzima iNOS. Microscopio de fluorescencia 20x. Barra=20µm.

4.6.3. Cuantificación de la intensidad de la señal para iNOS y Arg-1

4.6.3.1. Grupo A

Al cuantificar la intensidad de la señal positiva se obtuvieron datos numéricos, los cuales se graficaron y analizaron. En el grupo A, la mayor señal cuantificada para Arg-1 fue detectada en las células control (31 MFI), sin diferencia significativa con los demás tratamientos ($p=0.306$). Para la medición de iNOS, se observó que el tratamiento con mayor señal detectada fue el proveniente del desafío con esporas inactivadas en formol (36 MFI), con una diferencia significativa con las células control (17 MFI) ($p=0.024$). (Figura 23).

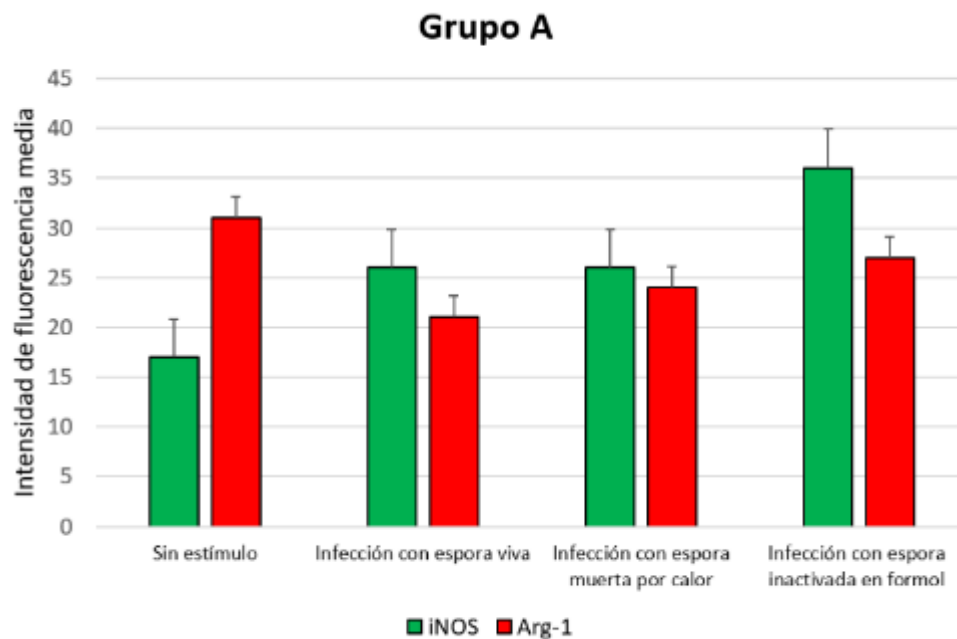


Figura 23. Cuantificación de la intensidad de la señal positiva para iNOS (verde) y Arg-1 (rojo) del grupo A. Diferencia significativa ($p<0.05$) en la cuantificación de iNOS en la infección con EIF. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos en la señal de Arg-1.

4.6.3.2. Grupo B

En células peritoneales de animales del grupo B, la señal detectada para iNOS en las células control fue de (19 MFI). No obstante, se apreció una discreta elevación de la señal fluorescente en las células desafiadas con esporas inactivadas en formol (23 MFI), aunque no hubo diferencia significativa ($p>0.05$) con los demás desafíos. La cuantificación de Arg-1 más elevada fue en las células que no recibieron estímulo *in vitro* (36 MFI) y fue diferentemente significativa ($p=0.05$) cuando se compararon con las células desafiadas con la espora viva (16 MFI) y con el desafío con esporas muertas por calor (23 MFI) (Figura 24).

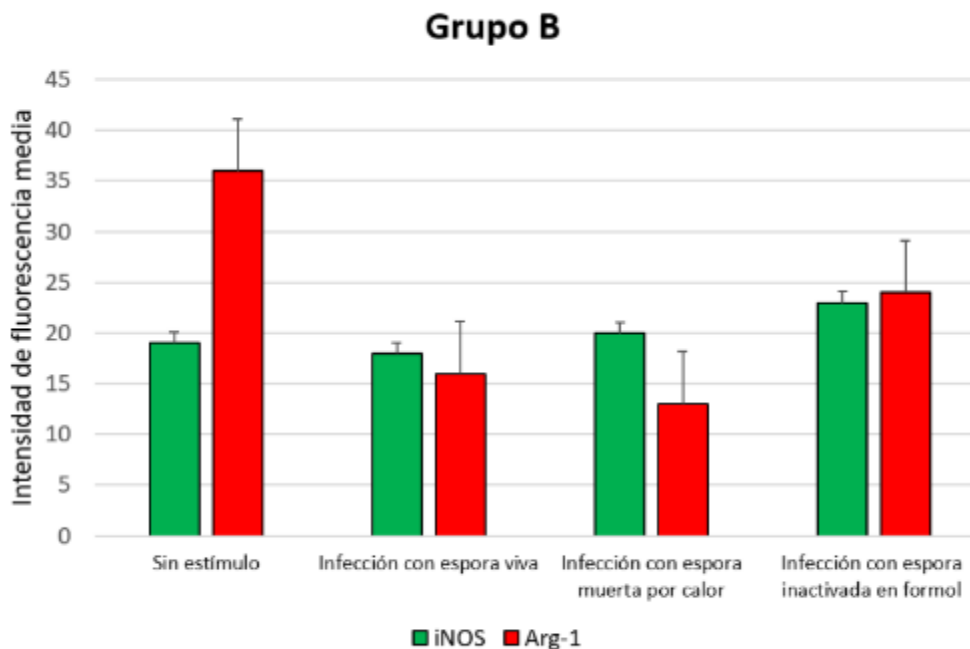


Figura 24. Cuantificación de la intensidad de la señal positiva para iNOS (verde) y Arg-1 (rojo) del grupo B. Diferencia significativa ($p<0.05$) en la cuantificación de Arg-1 en células sin estimular en comparación con EV y EMC. No se encontró diferencia significativa ($p>0.05$) entre los tratamientos en la señal de iNOS.

4.6.3.3. Comparación entre grupos A y B

Al realizar la comparación entre grupos se identifica que el grupo A produjo una mayor señal para Arg-1 (47 MFI) que para iNOS (39 MFI), lo contrario para el grupo B que tuvo mayor señal para iNOS (45 MFI) y una señal menor para Arg-1 (37 MFI). Entre grupos la detección de Arg-1 se presenta con diferencia significativa ($p=0.05$) y para iNOS no se encontró diferencia significativa (Figura 25).

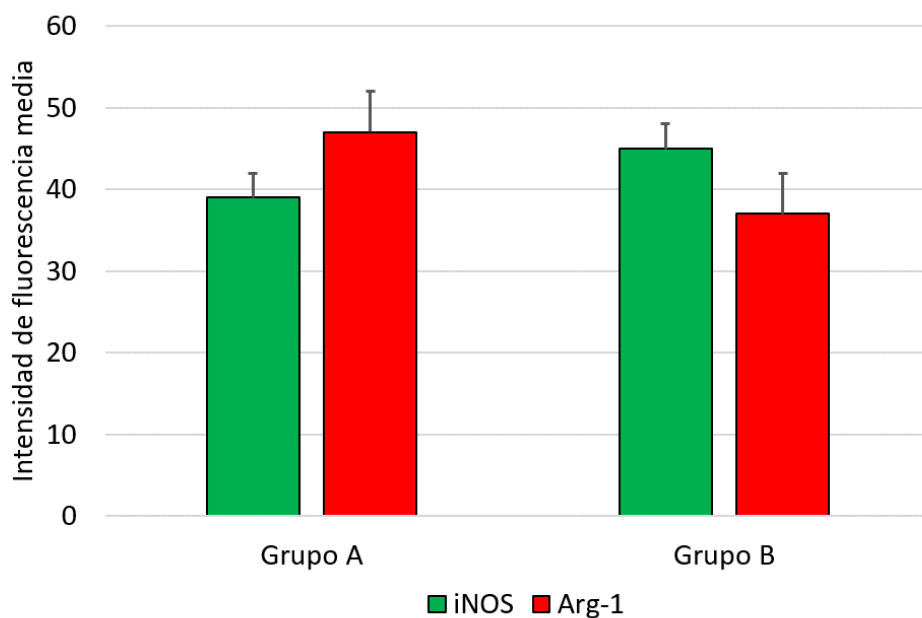


Figura 25. Cuantificación general de la señal positiva de ambos grupos. Señal de Arg-1 tuvo diferencia significativa $p=0.05$.

4.7. Reacción de Griess. Medición de nitritos

Las células peritoneales que tuvieron una mayor producción de nitritos en el medio de cultivo fue las de los animales del grupo A. De este grupo de animales, las células sin estimular, así como las desafiadas *in vitro* con las esporas vivas y muertas por calor presentaron una diferencia significativa ($p=0.007$) cuando se compararon con las células provenientes del grupo B. El grupo A mostró un elevado nivel de metabolitos derivados de nitritos (3.77, 4.26 y 3.7 mM), en comparación con las células provenientes de los ratones del grupo B, las cuales presentaron niveles de 2.43, 0.81 y 0.09 mM, respectivamente. No obstante, no hubo diferencia significativa entre las células peritoneales de los grupos A (1.3 mM) y B (1.15 mM), desafiados a las esporas muertas por calor (Figura 26).

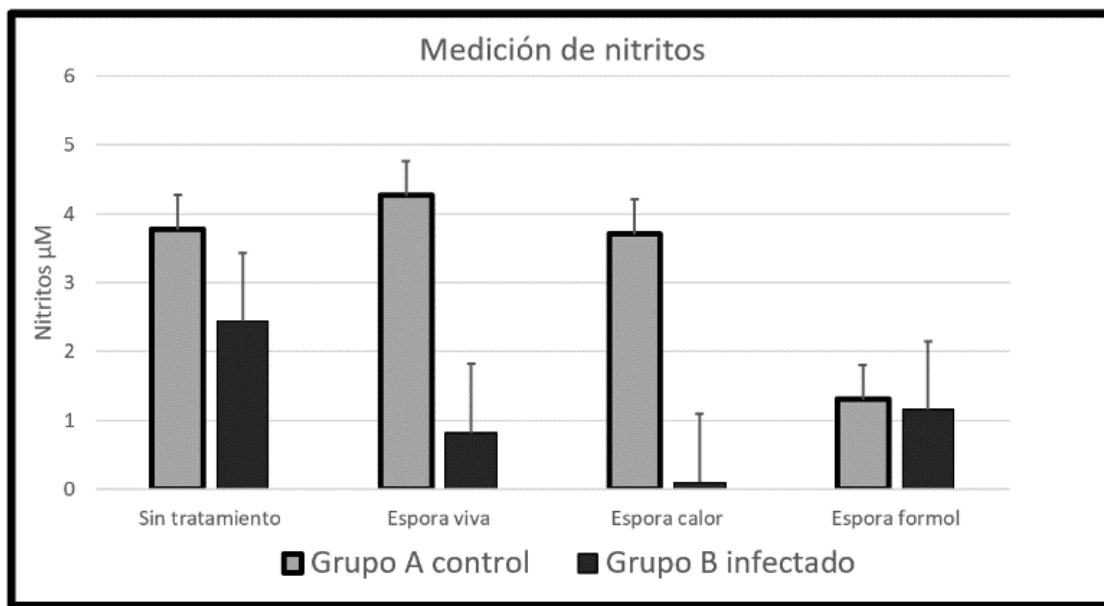


Figura 26. Concentración de nitritos en el sobrenadante de los cultivos celulares (nitrito extracelular), expresado en $\mu\text{M}/\text{pozo}$. El grupo A tuvo diferencia significativa ($p<0.05$) en comparación con el grupo B.

4.8. Ensayo de medición de la actividad de Arg-1

Las células peritoneales que tuvieron una mayor producción de Arg-1 provenían de los animales del grupo A al ser desafiadas *in vitro* con la espora viva (16.82 u/L), en comparación con las células del grupo B (9.90 u/L), aun así, no presentan una diferencia significativa ($p=0.317$). Al comparar las células peritoneales del grupo A y del grupo B, tanto los controles, como las células desafiadas con esporas muertas por calor y formalinizadas no presentaron diferencia significativa ($p=0.337$). No obstante, en este último desafío, se apreció una discreta elevación de Arg-1 en el grupo A (Figura 27).

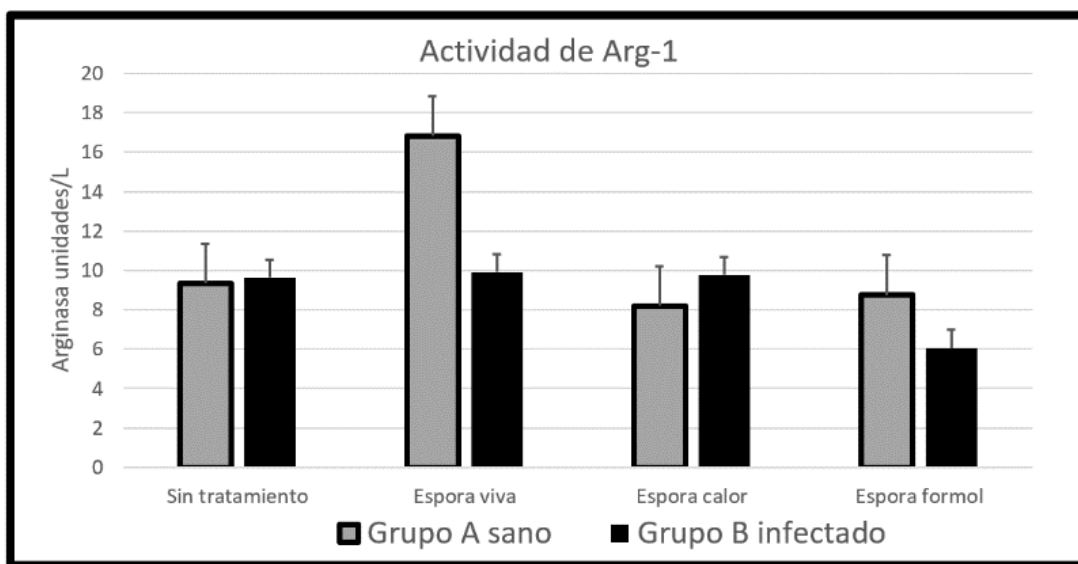


Figura 27. Cuantificación de la actividad de Arg-1 en el sobrenadante y lisado celular, expresado en unidades/L. Sin diferencia significativa entre los grupos $p>0.05$.

5. DISCUSIÓN

La respuesta inmune contra este parásito genera una intensa encefalitis y nefritis granulomatosas (Nevárez-Garza *et al.*, 2018). A pesar de su severidad en estos órganos, la infección en individuos inmunocompetentes es inaparente y asintomática la mayoría de las veces. El granuloma es una estructura compleja que representa un esfuerzo por parte de la respuesta inmune para eliminar o contener a las esporas. Esta respuesta inflamatoria se considera de carácter crónico y es característica de una hipersensibilidad de tipo IV (von Stebut, 2017). El granuloma microsporidiano es el resultado de un esfuerzo combinado de la inmunidad innata y adaptativa contra la espora de *E. cuniculi*, teniendo como punto convergente la participación, activación y diferenciación de células mononucleares, principalmente los macrófagos. Estas células fagocíticas juegan un papel central tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa, el cual depende de su estado de activación o polarización (Ting *et al.*, 2016) (Gordon & Martinez-Pomares, 2017).

En el presente trabajo, se realizó la identificación de los marcadores fenotípicos para macrófagos M1 (iNOS) y M2 (Arg-1), en los cultivos de células peritoneales obtenidas tanto de ratones Balb/c no infectados como infectados con esporas viables de *E. cuniculi* y posteriormente desafiados *in vitro* con diferentes presentaciones antigénicas de este microsporidio. Una de las razones de utilizar macrófagos murinos de origen peritoneal es porque están entre las células mejor estudiadas en términos de biología celular, desarrollo y respuesta inflamatoria hacia agentes patógenos intracelulares (Cassado *et al.*, 2015a), además de estar mejor caracterizadas que los macrófagos de origen esplénico o mieloide (Arranz *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017a). En esta tesis se demostró que los macrófagos peritoneales son capaces de estar en ambos perfiles fenotípicos, M1 a M2, y este balance pudiera depender del estímulo inicial *in vivo* y el posterior desafío *in vitro*.

Controles. En el presente estudio, se observó que los macrófagos no desafiados *in vitro*, tanto del grupo A como del B, fueron predominantemente positivos para Arg-1 (perfil de macrófagos M2) en comparación con la señal para iNOS (macrófagos M1). Esto coincide con otros trabajos en donde se obtuvieron macrófagos M2 de ratones Balb/c “no manipulados” o sin estímulo irritativo previo con LPS o caldo tioglicolato (Cassado *et al.*, 2015b). Según lo anterior, esta respuesta tipo M2 resultaría compresible para los animales

del grupo A, cuyo estado “basal” indicaría la presencia de macrófagos antiinflamatorios (M2) en cavidad peritoneal (Mills *et al.*, 2020). Una respuesta opuesta se esperaría para el grupo B, con infección activa y crónica, característica de una respuesta por macrófagos M1, pero no fue así. La respuesta positiva de iNOS intracelular no fue diferente del control, y también se observó una disminución de nitritos medibles en el sobrenadante de macrófagos del grupo B al compararse con el control. Las células peritoneales control del grupo B tuvieron una señal positiva intracelular para Arg-1 más elevada que las del grupo A. La razón por la cual los macrófagos control de los animales infectados resultaron positivos para Arg-1 se desconoce y es opuesta a la respuesta de los modelos murinos infectados con *Brucella* spp. (Caswell, 2019) o *Enterococcus faecium* (Leendertse *et al.*, 2009), donde una señalización positiva para iNOS (macrófagos M1), fue evidente. No obstante, nuestro trabajo coincidió con el de Pereira y colaboradores, quienes infectaron macrófagos de ratones C57BL/6J con esporas de *E. cuniculi* (Pereira *et al.*, 2019), y con Carli y colaboradores, en individuos infectados con *Paracoccidioides braziliensis* (de Carli *et al.*, 2016). En ambos estudios se observó una actividad antiinflamatoria tipo M2, la cual fue medible a nivel intracelular. Este trabajo parece confirmar que el fenotipo de macrófagos predominante en ratones sanos es el M2, mientras que los animales infectados (1 mes post infección), presentan niveles significativamente más elevados de macrófagos M2 en cavidad peritoneal. El fenotipo de macrófagos M1 permaneció sin cambios en ambos grupos. Un dato interesante es que tanto *P. braziliensis* como *E. cuniculi* contienen quitina en su pared celular (Brosson *et al.*, 2005; Puccia *et al.*, 2011). Aunque a la quitina se le conoce por ser inmunoestimulante e inmunomodulador (Nevárez-Garza *et al.*, 2018), probablemente después de un cierto periodo de exposición a microorganismos que la contienen, en modelos murinos la quitina pueda generar una respuesta antiinflamatoria sistémica (Vasconcelos *et al.*, 2013).

Esporas viables (EV). Los animales del grupo B que fueron desafiados *in vitro* con EV presentaron una respuesta de macrófagos M1 similar a la de los macrófagos M2. Esta respuesta positiva para iNOS, fue similar a la de los macrófagos control; sin embargo, la señalización para Arg-1 disminuyó en las células desafiadas a EV. Este resultado muestra que, en individuos clínicamente sanos o infectados con *E. cuniculi* (con macrófagos Arg-1 positivos), la respuesta a un desafío posterior con la EV mantendría una proporción

similar o equilibrada de macrófagos M1 y M2. Este resultado es similar con lo reportado en pacientes con tuberculosis espinal (Wang *et al.*, 2020). En dicho trabajo, se sugiere que los macrófagos M1 y M2 pueden actuar de manera dual o balanceada en la patogénesis de agentes infecciosos intracelulares, como *Mycobacterium* spp., *Cryptococcus neoformans* o *Trypanosoma cruzi*: 1) como primera línea de defensa o, 2) como célula huésped. En el primer caso, las citocinas participantes serían del tipo Th1, como el IFN- γ o TNF- α , resultando en una respuesta que promovería una polarización o una repolarización, según sea el caso, hacia el macrófago M1 (Davis *et al.*, 2013; Tarique *et al.*, 2015; Da Rocha *et al.*, 2019; Il'in & Shkurupy, 2020). En contraste, en el segundo caso, la respuesta ocurre debido a la presencia de citocinas tipo Th2, como IL-4 o IL-10, lo que favorecería la polarización hacia macrófagos M2 (antiinflamatorios), lo cual fue medible por la presencia de Arg-1 en el sobrenadante de los cultivos (Nevárez-Garza *et al.*, 2018). Esto coincidió con un estudio donde se midió la población de macrófagos M1 y M2 en el microambiente del granuloma microsporidiano, observándose una polarización o una repolarización hacia un fenotipo M2 en el centro de este (Castillo, 2021). Esto pudo ser medible también por la disminuida actividad de nitratos en el sobrenadante de los macrófagos del grupo B, pero con positividad para iNOS en su citoplasma. Esto pudiera sugerir que, 1) iNOS si estuvo presente en citoplasma, pero no hubo producción de NO a partir de arginina, o 2) el NO no se combinó con el radical superóxido y, por ende, no hubo formación de nitratos (NO₃⁻). Sin embargo, su posible utilización como mecanismo esporicida se desconoce. Esto coincide con lo observado por Tarique y colaboradores, quienes investigaron las propiedades fenotípicas y de plasticidad de los macrófagos al ser expuestos *in vitro* con perlas de látex y dextrán (Costa *et al.*, 2021). En dicho estudio, la actividad fagocítica o endocítica de los macrófagos M1 y M2, respectivamente, hacia esos compuestos fue medible *in vitro*, concluyéndose que dichas actividades se incrementaban a medida que el iNOS o Arg-1 en sobrenadante iba disminuyendo y su positividad iba aumentando en su citoplasma. Al parecer, durante el desafío *in vitro* con la EV, se generan factores solubles tipo Th1 y Th2, que dirigen una repolarización hacia macrófagos M1 para tener una interacción o aproximación más directa frente a *E. cuniculi*, y un mantenimiento de macrófagos M2, para internalizar a la espora viva mediante fagocitosis y albergarla en el macrófago (Wilson *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2018). Posiblemente *E.*

cuniculi pueda modular la respuesta inmune, primero para infectar y posteriormente para persistir en el huésped (Martinez & Gordon, 2014; Tamim El Jarkass & Reinke, 2020b).

Esporas muertas por calor (EMC). Los animales del grupo B desafiados con EMC mostraron una señal para iNOS elevada (aunque no diferente del control), en comparación con la señal obtenida para Arg-1. Sin embargo, la señal intracelular para Arg-1 del grupo control fue mayor. Al parecer, en la primera infección por *E. cuniculi* se mantiene un estado de polarización hacia macrófagos M2, pero durante un desafío posterior con EMC, su respuesta disminuye drásticamente, al mantenerse la señalización para macrófagos M1. Esto indicaría una necesidad de la espora viable para mantener un estado antiinflamatorio (Th2), para conservarse y protegerse en el huésped, lo cual no ocurrió cuando se utilizaron EMC durante el desafío (Leiro *et al.*, 2000). Esta situación es similar a la que ocurre durante la infección por huevos de *Schistosoma mansoni* y con esporas de *Cryptococcus neoformans*, los cuales favorecen la producción de Arg-1, necesaria para su proliferación, al inducir un microambiente antiinflamatorio (Tamim El Jarkass & Reinke, 2020a). Al cambiar las condiciones a un ambiente Th1, lo cual incrementa la producción de iNOS, *S. mansoni* and *C. neoformans* fallan para generar Arg-1. Lo anterior propone un requerimiento de citocinas tipo Th2, IL-4 o IL-10, para el mantenimiento de la infección (González-Machorro *et al.*, 2019a; Dávila-Martínez *et al.*, 2020). Los resultados del presente estudio plantean que las esporas de *E. cuniculi* tienen el potencial de modular la polarización del macrófago (Zanluqui, 2015), lo cual dependería del tiempo de la infección inicial y del estado físico de la espora al momento del desafío. Aunque no se contabilizó el número de esporas ingeridas *in vitro*, se puede proponer que un número elevado de EMC internalizadas en los macrófagos peritoneales pudo influir negativamente en la actividad tanto de los macrófagos M1 como de macrófagos M2, cuando se compararon con el grupo A. Esto difiere con otros estudios *in vitro*, donde las EMC tuvieron una menor tasa de fagocitosis (González-Machorro *et al.*, 2019b), y por ende una menor tasa de eliminación. La cantidad de nitratos en el sobrenadante fue casi indetectable, sugiriendo solo la presencia de iNOS por el macrófago M1, pero no su conversión a NO. En contraste, la cantidad de Arg-1 medible en el sobrenadante fue levemente mayor que la del grupo control. Lo anterior coincide con infecciones por *Trypanosoma cruzi*, donde el parásito promueve la producción simultánea de citocinas

Th1 y Th2, favoreciendo su desarrollo y su posterior proliferación dentro del huésped (Pereira *et al.*, 2019). La razón por la cual el desafío *in vitro* con EMC disminuyó la señal positiva de Arg-1, pero incrementó la de nitratos en el sobrenadante del grupo control se desconoce. Posiblemente un cambio en la estructura antigénica debido al calor que desnaturalizó proteínas importantes para la señalización hacia macrófagos M2 o impidió la generación de algún metabolito significativo para la generación de células Th2 (Barros *et al.*, 2019).

Esporas inactivadas con formol (EIF). Las células peritoneales de los animales infectados tuvieron una señal intracelular y en sobrenadante similar tanto para iNOS como para Arg-1, al ser desafiadas con EIF. Esto pudiera indicar que la estructura física de la espora de *E. cuniculi* (viable o inactivada), no influye en el perfil del macrófago M1 y M2 (Fischer *et al.*, 2008). Sin embargo, se observó una significativa diferencia en la actividad de ambas enzimas cuando se compararon con los grupos control, sobre todo para iNOS en el grupo A. Esta respuesta fue similar tanto intracelular como en los sobrenadantes de las células peritoneales desafiadas con EMC. Los animales infectados se encuentran en un estado inmunológico caracterizado por un perfil positivo para macrófagos M2 (Han *et al.*, 2020). Sin embargo, cuando se desafían *in vitro* a las EIF (EV o EMC), el estatus inmunológico que le sigue pudiera sugerir un perfil para macrófagos M1, pero lo que disminuye realmente es la señalización para Arg-1 en los ratones del grupo B. La razón de la aparente disminución de Arg-1 durante la exposición *in vitro* a las esporas en cualquier presentación antigénica se desconoce. Sin embargo, se puede indicar que los receptores en la membrana (TLR2 y TLR4) de los macrófagos encargados de reconocer glucanos y quitina (Soto-Domínguez *et al.*, 2020), y por ende responsables de generar un perfil M1, no reconocen la estructura antigénica superficial de las esporas al ser sometidas a calor o fijación (Han *et al.*, 2020). Esto ocasionaría cambios en la transducción de señales por parte de los TLR's del macrófago y de otras células centinela (células dendríticas, Th1, NK), que tendría como resultado lo siguiente: 1) Un incremento en la producción de IFN- γ y TNF- α . En consecuencia, la señal para producir ornitina sería afectada, ocasionando una disminución en la actividad de la arginasa sobre la arginina, o 2) Una disminución en la producción de IL-4 y, por ende, la señal para producir NO mediante iNOS a partir de arginina sería favorecida. Este delicado balance entre iNOS y

Arg-1, con las diferentes presentaciones antigénicas de *E. cuniculi*, sería determinante para la resistencia y modulación de *E. cuniculi* en ratones Balb/c.

Este estudio ha permitido conocer las características fenotípicas del macrófago murino durante una infección experimental por *E. cuniculi* con posterior desafío *in vitro* con EV, EMC y EIF. El mecanismo esporicida no se establece a los 30 días post infección. La espora viable puede promover una virulencia temprana para soportar su persistencia a largo plazo y superar cualquier señalización de polarización hacia macrófagos M1. Asimismo, los resultados de esta tesis abren estrategias terapéuticas a futuro para reprogramar a los macrófagos hacia un perfil M1, que sería de gran beneficio para mejorar el manejo de esta infección zoonótica.

6. CONCLUSIONES

Grupo A. Ratones Balb/c sin infección experimental

Los macrófagos M2 predominaron en el fluido peritoneal de los ratones Balb/c clínicamente sanos.

Los macrófagos M1 se activaron con las EV y EMC de *E. cuniculi*, lo contrario para macrófagos M2.

Las EIF estimularon la activación *in vitro* de los macrófagos M1 en mayor medida que cualquier otro desafío.

Grupo B. Infección Experimental en Ratones Balb/c

Los macrófagos del fenotipo M2 fueron activados durante la infección crónica con esporas vivas de *E. cuniculi*.

Los macrófagos M1 y M2 no se activaron durante el desafío *in vitro* con la EV ni con la EIF de *E. cuniculi*.

Los macrófagos M2 fueron inactivados con la EMC durante el desafío *in vitro*.

Los macrófagos M1 y M2 mostraron una coexistencia balanceada durante el desafío *in vitro* bajo el estímulo de las diferentes presentaciones antigénicas de las esporas de *E. cuniculi*.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Sigma-Aldrich. 2020. Activity, A., A. Kit, and P. Description. Technical bulletin.
- Ammerman, N.C., M. Beier-Sexton, and A.F. Azad. 2008. Growth and maintenance of Vero cell lines. *Curr. Protoc. Microbiol.* Appendix 4:Appendix-4E. doi:10.1002/9780471729259.mca04es11.
- Andrew, P.J., M. Auer, I.J.D. Lindley, H.F. Kauffmann, and A.J. Kungl. 1997. Intensity-independent fluorometric detection of cellular nitric oxide release. *FEBS Lett.* 408:319–323. doi:10.1016/S0014-5793(97)00449-3.
- Ara, J.A.R.A. 2005. Technical Aspects of Immunohistochemistry. 426:405–426.
- Arnold, C.E., C.S. Whyte, P. Gordon, R.N. Barker, A.J. Rees, and H.M. Wilson. 2014. A critical role for suppressor of cytokine signalling 3 in promoting M1 macrophage activation and function in vitro and in vivo. *Immunology.* 141:96–110. doi:10.1111/imm.12173.
- Arranz, A., M. Rudin, C. Zaragoza, and J. Ripoll. 2015. Fluorescent molecular tomography for in vivo imaging of mouse atherosclerosis. *Methods Mol. Biol.* 1339:367–376. doi:10.1007/978-1-4939-2929-0.
- Ashmawy, K.I., S.S. Abuakkada, and A.M. Awad. 2011. Seroprevalence of Antibodies to Encephalitozoon cuniculi and Toxoplasma gondii in Farmed Domestic Rabbits in Egypt. *Zoonoses Public Health.* 58:357–364. doi:10.1111/j.1863-2378.2010.01371.x.
- Babu, A., P. Chandrasekar, K. Lalith, P. Chandra, G. Reddy, K. Kumar, and B. Reddy. 2013. Immunofluorescence and its application in dermatopathology with oral manifestations: Revisited. *J. Orofac. Sci.* 5:2–8. doi:10.4103/0975-8844.113680.
- Bargielowski, I., and J.C. Koella. 2009. A Possible Mechanism for the Suppression of Plasmodium berghei Development in the Mosquito Anopheles gambiae by the Microsporidian Vavraia culicis. *PLoS One.* 4:e4676. doi:10.1371/journal.pone.0004676.

- Barrera Ramírez, L.M., M.E. Drago Serrano, J. Pérez Ramos, A.C. Zamora, F. Gómez Arroyo, T. Del Rosario Sainz Espuñes, and F. Mendoza Pérez. 2004. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev. del Inst. Nac. Enfermedades Respir.* 17:42–55.
- Barros, M.S., P.G. Lara, M.T. Fonseca, E.H. Moretti, L.R. Filgueiras, J.O. Martins, M.L. Capurro, A.A. Steiner, and A. Sá-Nunes. 2019. *Aedes aegypti* saliva impairs M1-associated proinflammatory phenotype without promoting or affecting M2 polarization of murine macrophages. *Parasites and Vectors.* 12:1–15. doi:10.1186/s13071-019-3487-7.
- Bigliardi, E. 2009. Microsporidia , enigmatic parasites. 0003. doi:10.1080/11250000109356418.
- Brosson, D., L. Kuhn, G. Prensier, C.P. Vivarès, and C. Texier. 2005. The putative chitin deacetylase of *Encephalitozoon cuniculi*: A surface protein implicated in microsporidian spore-wall formation. *FEMS Microbiol. Lett.* 247:81–90. doi:10.1016/j.femsle.2005.04.031.
- Bryan, N.S., and M.B. Grisham. 2007. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic. Biol. Med.* 43:645–657. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.04.026.
- Burnette, W.N. 1981. “Western Blotting”: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195–203. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5.
- Cabral, G.R. de A., Z.T. Wang, L.D. Sibley, and R.A. DaMatta. 2018. Inhibition of Nitric Oxide Production in Activated Macrophages Caused by *Toxoplasma gondii* Infection Occurs by Distinct Mechanisms in Different Mouse Macrophage Cell Lines . *Front. Microbiol.* . 9:1936.
- de Carli, M.L., M. Miyazawa, S. Nonogaki, N.K. Shirata, D.T. Oliveira, A.A.C. Pereira, and J.A.C. Hanemann. 2016. M2 macrophages and inflammatory cells in oral lesions of chronic paracoccidioidomycosis. *J. Oral Pathol. Med.* 45:141–147.

doi:10.1111/jop.12333.

- Cassado, A.A., M.R. D'Império Lima, and K.R. Bortoluci. 2015. Revisiting mouse peritoneal macrophages: Heterogeneity, development, and function. *Front. Immunol.* 6:1–9. doi:10.3389/fimmu.2015.00225.
- Caswell, C.C. 2019. Assessment of survival and replication of *Brucella* spp. in murine peritoneal macrophages. *Methods Mol. Biol.* 1960:181–189. doi:10.1007/978-1-4939-9167-9_16.
- Chacin-Bonilla, L. 2006. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection. *Invest Clin.* 47:105–107.
- Cherry, J.D., J.A. Olschowka, and M.K. O'Banion. 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J Neuroinflammation.* 11:98.
- Chumakov, M.P., A.I. Viting, O. V Konosh, and E.E. Ashmarina. 1970. [Cultivation of *Encephalitozoon* (*Nosema*) *cuniculi* microsporidia in cultures of human and mouse embryo fibroblasts]. *Med. Parazitol. (Mosk).* 39:643–7.
- Corporation, P. Griess Reagent System.
- Costa, L., D. Id, A. Marcelino, A. Saraiva, F.T. De, C. Konno, E. Cristina, and P. Id. 2021. *Encephalitozoon cuniculi* takes advantage of efferocytosis to evade the immune response. 1–21. doi:10.1371/journal.pone.0247658.
- Couzinet, S., E. Cejas, J. Schittny, P. Deplazes, R. Weber, and S. Zimmerli. 2000. Phagocytic uptake of *Encephalitozoon cuniculi* by nonprofessional phagocytes. *Infect. Immun.* 68:6939–6945. doi:10.1128/IAI.68.12.6939-6945.2000.
- Davis, M.J., T.M. Tsang, Y. Qiu, J.K. Dayrit, J.B. Freij, G.B. Huffnagle, and M.A. Olszewski. 2013. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio.* 4:1–10. doi:10.1128/mBio.00264-13.
- Desportes-Livage, I. 1997. Human microsporidiosis: new opportunistic infections. *Rev. Mex. Patol. Clínica.* 44:12–16.

- Didier, E.S. 2014. Mammalian Animal Models of Human Microsporidiosis. *In* Microsporidia. L.M. Weiss and J.J. Becnel, editors. John Wiley & Sons, Inc. 327–339.
- Didier, E.S., M.E. Stovall, L.C. Green, P.J. Brindley, K. Sestak, and P.J. Didier. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: Sources and modes of transmission. *Vet. Parasitol.* 126:145–166. doi:10.1016/j.vetpar.2004.09.006.
- Didier, E.S., and L.M. Weiss. 2006. Microsporidiosis: current status. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19:485–92. doi:10.1097/01.qco.0000244055.46382.23.
- Fang, F.C. 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:820–832. doi:10.1038/nrmicro1004.
- Feelisch, M., T. Rassaf, S. Mnaimneh, N. Singh, N.S. Bryan, D. Jourdain, and M. Kelm. 2002. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* 16:1775–1785. doi:10.1096/fj.02-0363com.
- Feito, M.J., R. Diez-Orejas, M. Cicuéndez, L. Casarrubios, J.M. Rojo, and M.T. Portolés. 2019. Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 176:96–105. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.12.063.
- Fischer, J., C. Suire, and H. Hale-Donze. 2008. Toll-like receptor 2 recognition of the microsporidia *Encephalitozoon* spp. induces nuclear translocation of NF- κ B and subsequent inflammatory responses. *Infect. Immun.* 76:4737–4744. doi:10.1128/IAI.00733-08.
- Flannagan, R.S., G. Cosío, and S. Grinstein. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:355–366. doi:10.1038/nrmicro2128.
- Franzen, C. 2005. How do microsporidia invade cells? *Folia Parasitol. (Praha).* 52:36–40. doi:10.14411/fp.2005.005.
- Franzen, C., P. Hartmann, and B. Salzberger. 2005. Cytokine and nitric oxide responses

- of monocyte-derived human macrophages to microsporidian spores. *Exp. Parasitol.* 109:1–6. doi:10.1016/j.exppara.2004.10.001.
- Ghosh, K., D. Schwartz, and L.M. Weiss. 2014. Laboratory Diagnosis of Microsporidia. 9781118395. 421-456 pp.
- Ghosh, K., and L.M. Weiss. 2011. T cell response and persistence of the microsporidia. *FEMS Microbiol.Rev.* 36:748–760. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00318.x.
- González-Machorro, J., L. Rodriguez-Tovar, R. Gómez-Flores, A. Soto-Dominguez, H. Rodriguez-Rocha, A. Garcia, P. Tamez-Guerra, and U. Castillo. 2019. Increased phagocytosis and growth inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* by LPS-activated J774A.1 murine macrophages. *Parasitol. Res.* 118. doi:10.1007/s00436-019-06310-0.
- González-Machorro, J., L. Rodriguez-Tovar, R. Gómez-Flores, A. Soto-Dominguez, H. Rodriguez-Rocha, A. Garcia, P. Tamez-Guerra, and U. Castillo. 2019. Increased phagocytosis and growth inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* by LPS-activated J774A.1 murine macrophages. *Parasitol. Res.* 118. doi:10.1007/s00436-019-06310-0.
- Gordon, S., and L. Martinez-Pomares. 2017. Physiological roles of macrophages. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 469:365–374. doi:10.1007/s00424-017-1945-7.
- Grisham, M.B., G.G. Johnson, and J.R. Lancaster Jr. 1996. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. *Methods Enzymol.* 268:237–246.
- Gundra, U.M., N.M. Girgis, D. Ruckerl, S. Jenkins, L.N. Ward, Z.D. Kurtz, K.E. Wiens, M.S. Tang, U. Basu-Roy, A. Mansukhani, J.E. Allen, and P. Loke. 2014. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood.* 123:110–122. doi:10.1182/blood-2013-08-520619.
- den Haan, J.M.M., and L. Martinez-Pomares. 2013. Macrophage heterogeneity in lymphoid tissues. *Semin. Immunopathol.* 35:541–552. doi:10.1007/s00281-013-0378-4.

- Han, B., and L.M. Weiss. 2017. Microsporidia: Obligate Intracellular Pathogens Within the Fungal Kingdom. *Microbiol. Spectr.* 5:10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.
- Han, Y., H. Gao, J. Xu, J. Luo, B. Han, J. Bao, G. Pan, T. Li, and Z. Zhou. 2020. Innate and Adaptive Immune Responses Against Microsporidia Infection in Mammals. *Front. Microbiol.* 11:1–11. doi:10.3389/fmicb.2020.01468.
- Hirt, R.P., J.M. Logsdon, B. Healy, M.W. Dorey, W.F. Doolittle, and T.M. Embley. 1999. Microsporidia are related to fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96:580–585. doi:10.1073/pnas.96.2.580.
- Jeklová, E., L. Levá, V. Kummer, V. Jekl, and M. Faldyna. 2019. Immunohistochemical detection of encephalitozoon cuniculi in ocular structures of immunocompetent rabbits. *Animals.* 9:1–7. doi:10.3390/ani9110988.
- Joseph, J., and S. Sharma. 2009. In vitro culture of various species of microsporidia causing keratitis: Evaluation of three immortalized cell lines. *Indian J. Med. Microbiol.* 27:35–39.
- Joseph, J., P.K. Vaddavalli, U. Gopinathan, and S. Sharma. 2006. Can donor cornea transmit microsporidial infection? *Indian J. Med. Microbiol.* 24:305–306.
- Jourd'heuil, D., F.L. Jourd'heuil, and M. Feelisch. 2003. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide: Evidence for a free radical mechanism. *J. Biol. Chem.* 278:15720–15726. doi:10.1074/jbc.M300203200.
- Kamada, N., S.U. Seo, G.Y. Chen, and G. Núñez. 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* 13:321–335. doi:10.1038/nri3430.
- Kelm, M. 1999. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1411:273–289. doi:10.1016/S0005-2728(99)00020-1.
- Keohane, E.M., G.A. Orr, P.M. Takvorian, A. Cali, H.B. Tanowitz, M. Wittner, and L.M. Weiss. 1996. Purification and characterization of human microsporidian polar

- tube proteins. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43:100S. doi:10.1111/j.1550-7408.1996.tb05023.x.
- Kepka-Lenhart, D., D.E. Ash, and S.M. Morris. 2008. Determination of Mammalian Arginase Activity. *Methods Enzymol.* 440:221–230. doi:10.1016/S0076-6879(07)00813-0.
- Khan, I.A., M. Moretto, and L.M. Weiss. 2001. Immune response to *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Microbes Infect.* 3:401–5.
- Kigerl, K.A., J.C. Gensel, D.P. Ankeny, J.K. Alexander, D.J. Donnelly, and P.G. Popovich. 2009. Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord. 29:13435–13444. doi:10.1523/JNEUROSCI.3257-09.2009.
- Kingdom, F. 2017. HHS Public Access. 5:1–26. doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0018-2016.Microsporidia.
- Kropf, P., D. Baud, S.E. Marshall, M. Munder, A. Mosley, J.M. Fuentes, C.R.M. Bangham, G.P. Taylor, S. Herath, B.-S. Choi, G. Soler, T. Teoh, M. Modolell, and I. Müller. 2007. Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy. *Eur. J. Immunol.* 37:935–945. doi:10.1002/eji.200636542.
- Kulkarni, S. V, R. Kairon, S.S. Sane, P.S. Padmawar, V.A. Kale, M.R. Thakar, S.M. Mehendale, and A.R. Risbud. 2009. Opportunistic parasitic infections in HIV/AIDS patients presenting with diarrhoea by the level of immunesuppression. *Indian J.Med.Res.* 130:63–66.
- Künzel, F., and P.G. Fisher. 2018. Clinical Signs, Diagnosis, and Treatment of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Rabbits. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 21:69–82. doi:10.1016/j.cvex.2017.08.002.
- Künzel, F., and A. Joachim. 2010. *Encephalitozoonosis* in rabbits. *Parasitol. Res.* 106:299–309. doi:10.1007/s00436-009-1679-3.
- Lacy, P., and J.L. Stow. 2011. Cytokine release from innate immune cells: Association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood.* 118:9–18. doi:10.1182/blood-

2010-08-265892.

- Lakhtin, M. V, V.M. Lakhtin, S.S. Afanasiev, V.A. Aleshkin, and A.Y. Mironov. 2018. [Lectins and glycoconjugates in presentation of antigens and protection against pathogens.]. *Klin. Lab. Diagn.* 63:619–625. doi:10.18821/0869-2084-2018-63-10-619-625.
- Lallo, M.A., L.F.V. da Costa, and J.M. de Castro. 2013. Effect of Three Drugs against *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Immunosuppressed Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:3067–3071. doi:10.1128/aac.00157-13.
- Latib, M.A., M.D. Pascoe, M.S. Duffield, and D. Kahn. 2001. Microsporidiosis in the graft of a renal transplant recipient. *Transpl.Int.* 14:274–277.
- Leendertse, M., R.J.L. Willems, I.A.J. Giebelen, J.J.T.H. Roelofs, N. van Rooijen, M.J.M. Bonten, and T. van der Poll. 2009. Peritoneal macrophages are important for the early containment of *Enterococcus faecium* peritonitis in mice. *Innate Immun.* 15:3–12. doi:10.1177/1753425908100238.
- Leiro, J., M. Ortega, M.L. Sanmartín, and F.M. Ubeira. 2000. Non-specific responses of Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) adherent cells to microsporidian spores. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 75:81–95. doi:10.1016/S0165-2427(00)00186-0.
- Levine, A.B., D. Punihaole, and T.B. Levine. 2012. Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications. *Cardiology.* 122:55–68. doi:10.1159/000338150.
- Li, H.U.I., C.J. Meininger, J.R. Hawker, T.E. Haynes, D. Kepka-lenhart, S.K. Mistry, S.M. Morris, C.J. Meininger, J.R. Hawker, T.E. Haynes, D. Kepka-lenhart, S.K. Mis-, S.M. Morris, and G.W. Regulatory. 2020. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide , polyamine , and proline syntheses in endothelial cells. 75–82.
- Li, Z., Z.J. Zhao, X.Q. Zhu, Q.S. Ren, F.F. Nie, J.M. Gao, X.J. Gao, T.B. Yang, W.L. Zhou, J.L. Shen, Y. Wang, F.L. Lu, X.G. Chen, G. Hide, F.J. Ayala, and Z.R. Lun. 2012. Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection. *PLoS One.* 7.

doi:10.1371/journal.pone.0035834.

Lichtman, J.W., and J.-A. Conchello. 2005. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods*. 2:910–919. doi:10.1038/nmeth817.

Liu, Y.C., X.B. Zou, Y.F. Chai, and Y.M. Yao. 2014. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int.J Biol Sci.* 10:520–529.

Locati, M., G. Curtale, and A. Mantovani. 2020. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15:123–147. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718.

Lom, J., and I. Dykov. 1992. Microsporidia (Phylum _Microspora_ Sprague, 1977). In *Protozoan parasites of fishes*. Elsevier, Amsterdam. 125–157.

Lysing, F.C.M., and S. Vacuum. 2000. Flow cytometry protocol. 14–16.

Mak, J.W. 2004. Important zoonotic intestinal protozoan parasites in Asia. *Trop.Biomed.* 21:39–50.

Malyshev, I., and Y. Malyshev. 2015. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage “switch” phenotype. *Biomed Res. Int.* 2015. doi:10.1155/2015/341308.

Martinez, F.O., and S. Gordon. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime.Rep.* 6:13.

Martinez, F.O., S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani. 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177:7303–11. doi:10.4049/jimmunol.177.10.7303.

Mathis, A., R. Weber, and P. Deplazes. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin. Microbiol. Rev.* 18:423–445. doi:10.1128/CMR.18.3.423-445.2005.

Matzinger, P. 2002. An innate sense of danger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961:341–342. doi:10.1111/j.1749-6632.2002.tb03118.x.

McKinnon, K.M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr. Protoc. Immunol.*

- 120:5.1.1-5.1.11. doi:10.1002/cpim.40.
- Metchnikoff, I. 2015. Mini- review: Macrophage Polarization. *Biorad*. 2:1–8.
doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0157.
- Mills, C.D. 2012. M1 and M2 Macrophages : Oracles of Health and Disease. 32:463–488.
- Mills, C.D., K. Kincaid, J.M. Alt, J. Michelle, A.M. Hill, M.-M.- Macrophages, T. Paradigm, C.D. Mills, K. Kincaid, J.M. Alt, M.J. Heilman, and A.M. Hill. 2020. M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm.
doi:10.4049/jimmunol.164.12.6166.
- Morris, J.A., J.M. McCown, and R.E. Blount. 1956. Ascites and Hepatosplenomegaly in Mice Associated with Protozoan-like Cytoplasmic Structures. *J. Infect. Dis*. 98:306–311. doi:10.1093/infdis/98.3.306.
- Morris, S.M. 2004. Enzymes of Arginine Metabolism 1 , 2. 2743–2747.
- Munder, M. 2009. Arginase: An emerging key player in the mammalian immune system: REVIEW. *Br. J. Pharmacol*. 158:638–651. doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00291.x.
- Munder, M., K. Eichmann, J.M. Morán, F. Centeno, G. Soler, and M. Modolell. 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J. Immunol*. 163:3771–7. doi:163:3771-3777.
- Murray, P.J., J.E. Allen, S.K. Biswas, E.A. Fisher, D.W. Gilroy, S. Goerdt, S. Gordon, J.A. Hamilton, L.B. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F.O. Martinez, J.-L. Mege, D.M. Mosser, G. Natoli, J.P. Saeij, J.L. Schultze, K.A. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J.A. van Ginderachter, S.N. Vogel, and T.A. Wynn. 2014. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity*. 41:14–20.
doi:https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.008.
- Nairz, M., A. Schroll, T. Sonnweber, and G. Weiss. 2010. The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface. *Cell. Microbiol*. 12:1691–1702. doi:10.1111/j.1462-

5822.2010.01529.x.

Nevárez-Garza, A.M., U. Castillo-Velázquez, A. Soto-Domínguez, R. Montes-de-Oca-Luna, D.E. Zamora-Ávila, A. Wong-González, and L.E. Rodríguez-Tovar. 2018. Quantitative analysis of TNF- α IL-4, and IL-10 expression, nitric oxide response, and apoptosis in *Encephalitozoon cuniculi*-infected rabbits. *Dev. Comp. Immunol.* 81:235–243. doi:10.1016/j.dci.2017.12.004.

Neworal, E.P.M., A. Altemani, R.L. Mamoni, I.L. Noronha, and M.H.S.L. Blotta. 2003. Immunocytochemical localization of cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in oral mucosa and lymph nodes of patients with paracoccidioidomycosis. *Cytokine.* 21:234–41.

Oishi, S., R. Takano, S. Tamura, S. Tani, M. Iwaizumi, Y. Hamaya, K. Takagaki, T. Nagata, S. Seto, T. Horii, S. Osawa, T. Furuta, H. Miyajima, and K. Sugimoto. 2016. M2 polarization of murine peritoneal macrophages induces regulatory cytokine production and suppresses T-cell proliferation. *Immunology.* 149:320–328. doi:10.1111/imm.12647.

OLIVER, J. 1924. MORPHOLOGIC DIFFERENTIATION OF MENNINGO-ENCEPHALITIS OF RABBITS AND EPIDEMIC (LETHARGIC) ENCEPHALITIS: WITH A NOTE ON THE OCCURRENCE OF PARASITES IN THE FORMER DISEASE. *Arch. Neurol. Psychiatry.* 11:321–327. doi:10.1001/archneurpsyc.1924.02190330071006.

Pereira, A., A.M. Alvares-saraiva, F.T. De, C. Konno, D.D. Spadacci-morena, E. Cristina, P. Id, M. Mariano, M. Anete, and L. Id. 2019. B-1 cell-mediated modulation of M1 macrophage profile can ameliorate microbicidal functions and disrupt the evasion mechanisms of *Encephalitozoon cuniculi*. 1–22.

Quero, L., E. Hanser, T. Manigold, A.N. Tiaden, and D. Kyburz. 2017. TLR2 stimulation impairs anti-inflammatory activity of M2-like macrophages , generating a chimeric M1 / M2 phenotype. 1–13. doi:10.1186/s13075-017-1447-1.

Ramos-Vara, J.A., M. Kiupel, T. Baszier, L. Bliven, B. Brodersen, B. Chelack, S. Czub, F. Del Piero, S. Dial, E.J. Ehrhart, T. Graham, L. Manning, D. Paulsen, V.E. Valli,

- and K. West. 2008. Suggested guidelines for immunohistochemical techniques in veterinary diagnostic laboratories. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 20:393–413. doi:10.1177/104063870802000401.
- Rath, M., I. Müller, P. Kropf, E.I. Closs, and M. Munder. 2014. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase : two competing arginine pathways in macrophages. 5:1–10. doi:10.3389/fimmu.2014.00532.
- Reetz, J., K. Nöckler, S. Reckinger, M.M. Vargas, W. Weiske, and A. Broglia. 2009. Identification of *Encephalitozoon cuniculi* genotype III and two novel genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in swine. *Parasitol. Int.* 58:285–92. doi:10.1016/j.parint.2009.03.002.
- Rodríguez-Tovar, L.E., A.M. Nevárez-Garza, A. Trejo-Chávez, C.A. Hernández-Martínez, G. Hernández-Vidal, J.J. Zarate-Ramos, and U. Castillo-Velázquez. 2016. *Encephalitozoon cuniculi*: Grading the Histological Lesions in Brain, Kidney, and Liver during Primoinfection Outbreak in Rabbits. *J. Pathog.* 2016:5768428. doi:10.1155/2016/5768428.
- Rodríguez-Tovar, L.E., A. Villarreal-Marroquín, A.M. Nevárez-Garza, U. Castillo-Velázquez, H.G. Rodríguez-Ramírez, M.C. Navarro-Soto, J.J. Zárate-Ramos, G. Hernández-Vidal, and A. Trejo-Chávez. 2017. Histochemical study of *Encephalitozoon cuniculi* spores in the kidneys of naturally infected New Zealand rabbits. *J. Vet. Diagnostic Investig.* 29:269–277. doi:10.1177/1040638716668559.
- Rosell, J.M., and L.F. de la Fuente. 2009. Culling and mortality in breeding rabbits. *Prev. Vet. Med.* 88:120–127. doi:https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.08.003.
- Roszer, T. 2015. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2015:16–18. doi:10.1155/2015/816460.
- Ruth, B.C., A.T. Haroldo, N. S. Priya, and C. R. William. 2015. Arginase: an old enzyme with new tricks. *Trends Pharmacol. Sci.* 36:395–405. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303790.The.

- Sanderson, M.J., I. Smith, I. Parker, and M.D. Bootman. 2016. Cold Spring Harb Protoc. *Physiol. Behav.* 2014:1–36. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
- Schwendemann, J., B. Sehringer, C. Noethling, H.P. Zahradnik, and W.R. Schaefer. 2008. Nitric oxide detection by DAF (diaminofluorescein) fluorescence in human myometrial tissue. *Gynecol. Endocrinol.* 24:306–311. doi:10.1080/09513590801994063.
- Seong, S.-Y., and P. Matzinger. 2004. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4:469–478. doi:10.1038/nri1372.
- Sessa, W.C., and U. Fo. 2012. Nitric oxide synthases : regulation and function. 829–837. doi:10.1093/eurheartj/ehr304.
- Shadduck, J.A., and S.P. Pakes. 1971. Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *Am.J.Pathol.* 64:657–672.
- Smith, H., and R.A.B. Nichols. 2006. Zoonotic protozoa--food for thought. *Parassitologia.* 48:101–4.
- Soldano, S., A.C. Trombetta, P. Contini, V. Tomatis, B. Ruaro, R. Brizzolara, P. Montagna, A. Sulli, S. Paolino, C. Pizzorni, V. Smith, and M. Cutolo. 2018. Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 77:1842–1845. doi:10.1136/annrheumdis-2018-213648.
- Soto-Domínguez, A., C. Dávila-Martínez, U. Castillo-Velázquez, A.M. Nevárez-Garza, H. Rodríguez-Rocha, O. Saucedo-Cárdenas, A.Y. Arce Mendoza, J.J. Zarate-Ramos, and L.E. Rodríguez-Tovar. 2020. Variation of the CD4, CD8, and MHC II cell population in granulomas of immunocompetent and immunosuppressed rabbits in Encephalitozoon cuniculi infection. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 68:101387. doi:10.1016/j.cimid.2019.101387.
- De Sousa, J.R., P.F.D.C. Vasconcelos, and J.A.S. Quaresma. 2019. Functional aspects, phenotypic heterogeneity, and tissue immune response of macrophages in

- infectious diseases. *Infect. Drug Resist.* 12:2589–2611. doi:10.2147/IDR.S208576.
- Spitzer, P., J. Weinbeer, M. Herrmann, T.J. Oberstein, M. Condic, P. Lewczuk, J. Kornhuber, and J.M. Maler. 2019. Analysis of Surface Levels of IL-1 Receptors and Macrophage Scavenger Receptor I in Peripheral Immune Cells of Patients With Alzheimer Disease. 32:211–220. doi:10.1177/0891988719841728.
- von Stebut, E. 2017. Was ist ein Granulom? *Hautarzt.* 68:520–525. doi:10.1007/s00105-017-4000-x.
- Tamim El Jarkass, H., and A.W. Reinke. 2020. The ins and outs of host-microsporidia interactions during invasion, proliferation and exit. *Cell. Microbiol.* 22:1–12. doi:10.1111/cmi.13247.
- Tamir, H., and S. Ratner. 1963. Enzymes of arginine metabolism in chicks. *Arch. Biochem. Biophys.* 102:249–258. doi:10.1016/0003-9861(63)90178-4.
- Tang, D., R. Kang, C.B. Coyne, H.J. Zeh, and M.T. Lotze. 2013. PAMPs and DAMPs: signals Os taht spur autophagy and inmunity. *Immunol Rev.* 249:158–175. doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01146.x.PAMPs.
- Thorn, K. 2016. A quick guide to light microscopy in cell biology. *Mol. Biol. Cell.* 27:219–222. doi:10.1091/mbc.E15-02-0088.
- Ting, J.P., M.A. Cassatella, and K. Ley. 2016. How Mouse Macrophages Sense what is Going On. 7:1–17. doi:10.3389/fimmu.2016.00204.
- Tizard, I.R. 2018. Veterinary Immunology. 10th ed. Elsevier Health Sciences, NY. 615 pp.
- Tomiotto-Pellissier, F., B.T. da S. Bortoleti, J.P. Assolini, M.D. Gonçalves, A.C.M. Carloto, M.M. Miranda-Sapla, I. Conchon-Costa, J. Bordignon, and W.R. Pavanelli. 2018. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front. Immunol.* 9:2529. doi:10.3389/fimmu.2018.02529.
- Tosoni, A., M. Nebuloni, A. Ferri, S. Bonetto, S. Antinori, M. Scaglia, L. Xiao, H. Moura, G.S. Visvesvara, L. Vago, and G. Costanzi. 2002. Disseminated

- microsporidiosis caused by *Encephalitozoon cuniculi* III (dog type) in an Italian AIDS patient: A retrospective study. *Mod. Pathol.* 15:577–583.
doi:10.1038/modpathol.3880566.
- Tripathi, P., P. Tripathi, L. Kashyap, and V. Singh. 2007. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51:443–452.
doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x.
- Varki, A. 2011. Letter to the Glyco-Forum: Since there are PAMPs and DAMPs, there must be SAMPs? Glycan “self-associated molecular patterns” dampen innate immunity, but pathogens can mimic them. *Glycobiology.* 21:1121–1124.
doi:10.1093/glycob/cwr087.
- Vasconcelos, D.P., A.C. Fonseca, M. Costa, I.F. Amaral, M.A. Barbosa, A.P. Águas, and J.N. Barbosa. 2013. Macrophage polarization following chitosan implantation. *Biomaterials.* 34:9952–9959. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.012.
- Vergneau-Grosset, C., and S. Larrat. 2016. Microsporidiosis in Vertebrate Companion Exotic Animals. *J. Fungi.* 2__ :1–20.
- Wang, L., X. Shang, X. Qi, D. Ba, J. Lv, X. Zhou, H. Wang, N. Shaxika, J. Wang, and X. Ma. 2020. Clinical Significance of M1/M2 Macrophages and Related Cytokines in Patients with Spinal Tuberculosis. *Dis. Markers.* 2020.
doi:10.1155/2020/2509454.
- Wang, M., H. Chiu, and J. Wang. 2012. Infection in a Rabbit 1,2. 38:1–6.
- Wang, Y., W. Smith, D. Hao, B. He, and L. Kong. 2019. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *Int. Immunopharmacol.* 70:459–466. doi:10.1016/j.intimp.2019.02.050.
- Weber, R., P. Deplazes, M. Flepp, A. Mathis, R. Baumann, B. Sauer, H. Kuster, and R. Lüthy. 1997. Cerebral Microsporidiosis Due to *Encephalitozoon cuniculi* in a Patient with Human Immunodeficiency Virus Infection. *N. Engl. J. Med.* 336:474–478. doi:10.1056/NEJM199702133360704.
- Weischer, B. 2000. Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes. *J.*

- Phytopathol.* 148:637–642. doi:10.1046/j.1439-0434.2000.00579.x.
- Weiss, G., and U.E. Schaible. 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* 264:182–203. doi:10.1111/imr.12266.
- Wilson, M.S., M.M. Mentink-Kane, J.T. Pesce, T.R. Ramalingam, R. Thompson, and T.A. Wynn. 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell Biol.* 85:148–154. doi:10.1038/sj.icb.7100014.
- Wright, J.H., and E.M. Craighead. 1922. INFECTIOUS MOTOR PARALYSIS IN YOUNG RABBITS. *J. Exp. Med.* 36:135–40.
- Wu, G., and S.M. Morris. 1998. Arginine metabolism : nitric oxide and beyond. 17:1–17.
- Wynn, T.A., A. Chawla, and J.W. Pollard. 2013. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature.* 496:445–455. doi:10.1038/nature12034.
- Yeramian, A., L. Martin, N. Serrat, L. Arpa, C. Soler, J. Bertran, C. McLeod, M. Palacín, M. Modolell, J. Lloberas, and A. Celada. 2006. Arginine Transport via Cationic Amino Acid Transporter 2 Plays a Critical Regulatory Role in Classical or Alternative Activation of Macrophages. *J. Immunol.* 176:5918–5924. doi:10.4049/jimmunol.176.10.5918.
- Yoshida, K., and K. Kasama. 1987. Biotransformation of nitric oxide. *Environ. Health Perspect.* 73:201–205. doi:10.1289/ehp.8773201.
- Yunna, C., H. Mengru, W. Lei, and C. Weidong. 2020. Macrophage M1/M2 polarization. *Eur. J. Pharmacol.* 877:173090. doi:10.1016/j.ejphar.2020.173090.
- Zanluqui, N.G. 2015. Macrophage Polarization in Chagas Disease. *J. Clin. Cell. Immunol.* 06:1–6. doi:10.4172/2155-9899.1000317.
- Zidwick, M.J., and P. Rogers. 1982. The determination by radiochemical assay of argininosuccinase produced in an Escherichia coli system in vitro. *Biochem. J.* 207:529–533. doi:10.1042/bj2070529.
- Zindel, J., and P. Kubes. 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile

Inflammation. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 15:493–518. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847.

Zumla, A., and D. Geraint James. 1996. Granulomatous infections: Etiology and classification. *Clin. Infect. Dis.* 23:146–158. doi:10.1093/clinids/23.1.146.

ÁPENDICE

A.- TÉCNICAS Y MÉTODOS

A. 1 Tinción con Calcoflúor White (muestra de orina)

- 1.- Colocar frotis de la muestra sobre la laminilla
- 2.- Fijar con metanol por 5 minutos
- 3.- Dejarlo secar
- 4.- Cubrir cualquier fuente de luz
- 5.- Colocar con pipeta el producto de tinción
- 6.- Dejar la tinción por 5 minutos a TA
- 7.- Retirar la tinción con agua destilada usando una piseta sin rociar directo a la muestra
- 8.- Dejar secar en la oscuridad
- 9.- Montar con glicina, siempre protegiendo la laminilla de la luz
- 10.- Observar en microscopio de epifluorescencia para buscar esporas

A. 2 Cultivo de células Vero

- 1.- Pasar el crio vial de -80°C a -20°C durante 20 minutos
- 2.- Descongelar el crio vial en bloque de calor a 37°C

- 3.- Transferir el contenido a un frasco de cultivo de 25cm² (a partir de este paso se realiza en campana de bioseguridad en condiciones de esterilidad)
- 4.- Agregar 4ml de medio de cultivo RPMI 1640
- 5.- Incubar a 37°C, con CO₂ al 5% y con una humedad del 95% por 24 horas
- 6.- Al día siguiente desechar el medio de cultivo y realizar un lavado con PBS estéril
- 7.- Colocar 4 ml de medio de cultivo nuevo
- 8.- Incubar

A. 3 Propagación de la spora E. cuniculi en cultivo celular Vero

- 1.- Agregar 6.0x10⁶ esporas en 1ml de medio RPMI a los cultivos de células Vero
- 2.- Incubar a 37°C, con CO₂ al 5% y con una humedad del 95%
- 3.- Cambiar medio cada 3 días y colectar el sobrenadante (mantener en refrigeración)
- 4.- Realizar pases con tripsina al tener 95% de confluencia

A. 4 Colección de esporas

- 1.- Raspar los cultivos infectados con Scraper.
- 2.- Vaciar el contenido en tubo Falcon
- 3.- Centrifugar a 1750rpm durante 10 minutos a 4°C
- 4.- Decantar sobrenadante y re suspender pellet en 1ml de medio RPMI
- 5.- Pasar la solución a través de aguja de 26mm
- 5.- Depositar la solución en tubo eppendorf de 1.5ml
- 6.- Realizar 3 veces el paso anterior
- 7.- Centrifugar a 4000rpm durante 20 minutos a 4°C
- 8.- Desechar sobrenadante
- 9.- Resuspender pellet en 1ml de RPMI

A. 5 Conteo de esporas

- 1.- Homogenizar la suspensión en Vortex
- 2.- Tomar 10µl de la solución y colocar en tubo de micro centrifuga
- 3.- Añadir 190µl de RPMI y homogenizar
- 4.- Preparar cámara de Neubauer con cubreobjetos cuadrado
- 5.- Colocar 10µl de la dilución en la cámara de Neubauer
- 6.- Observar en microscopio de luz blanca con el objetivo 100X
- 7.- Contar las esporas en las 5 cuadrículas pequeñas del centro
- 8.- Utilizar la fórmula para obtener el total de esporas
- 9.- Separar en alícuotas de 10×10^6
- 10.- Almacenar a 4°C

A. 6 Tratamiento para esporas muertas por calor

- 1.- Tomar la cantidad de esporas requerida y colocar en tubo eppendorf
- 2.- Programar el bloque térmico a 90°C
- 3.- Colocar el tubo eppendorf en el bloque térmico durante 30 minutos
- 4.- Dejar enfriar y almacenar a 4°C

A. 7 Tratamiento para esporas inactivadas en formol

- 1.- Tomar la cantidad de esporas requerida y colocar en tubo eppendorf
- 2.- Centrifugar a 1500g por minuto durante 10 minutos a 4°C
- 3.- Descartar sobrenadante
- 4.- Resuspender pellet en 1ml de formol al 10%
- 5.- Dejar actuar el solvente durante 30 minutos
- 6.- Centrifugar a 1500g por minuto durante 10 minutos a 4°C

- 7.- Descartar el formol
- 8.- Resuspender pellet en RPMI
- 9.- Centrifugar a 1500g por minuto durante 10 minutos a 4°C
- 10.- Descartar sobrenadante
- 11.- Resuspender pellet en 1ml de RPMI
- 12.- Almacenar a 4°C

A. 8 Establecer cultivo primario a partir de células peritoneales

- 1.- Administrar por vía intraperitoneal 0.5ml de RPMI frio
- 2.- Dejar pasar 30 minutos
- 3.- Anestesiar a los animales (inyección vía intramuscular)
- 4.- Sacrificar por medio de dislocación cervical
- 5.- Rociar al ratón con alcohol al 70%
- 6.- Fijar a una base de poliestireno
- 7.- Diseccionar la piel del abdomen y exponer el peritoneo
- 8.- Por medio de un catéter inyectar 5ml adicionales
- 9.- Dar masaje manual sobre el peritoneo
- 10.- Extraer por medio de jeringa el líquido inyectado
- 11.- Depositar la solución en tubo Falcon y mantenerlo en hielo
- 12.- Repetir paso 8, 9, 10 y 11
- 13.- Tomar 10µl de la solución celular y homogenizar con 10µl de azul de tripano
- 14.- Colocar 10µl sobre la cámara de Neubauer
- 15.- Visualizar en el microscopio en el objetivo 40X y contar las células no teñidas de los 4 cuadros de las orillas.

16.- Repartir el número de células en los frascos de cultivo de 25cm² y en las microcámaras

17.- Mantener en incubación durante 24 horas

18.- Hacer un lavado con PBS y colocar medio de cultivo nuevo.

A. 9 Inmunofluorescencia en microcámara

1.- Remover medio de cultivo

2.- Hacer 2 lavados con PBS estéril

3.- Adicionar 300µl de metanol e incubar por 10 min a TA

4.- Remover el fijador y realizar dos lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno

5.- Adicionar 300µl de suero de caballo al 10%

6.- Incubar durante 1 hora a TA

7.- Remover el suero de caballo (No lavar)

8.- Adicionar anticuerpos primarios e incubar toda la noche a 4°C

9.- Recuperar el Ac primario

10.- Realizar 2 lavados con PBS-T de 5 minutos cada uno

11.- Incubar con el Ac secundario durante 2 horas a TA en la oscuridad

12.- Recuperar Ac secundario y realizar 2 lavados con PBS 1X de 5 minutos cada uno siempre protegiendo de la luz

13.- Desmontar cámara

14.- Colocar 1 gota del medio de montaje con DAPI a cada uno de los micro pozos

15.- Colocar el cubreobjetos

16.- Visualizar en microscopio de fluorescencia o almacenar laminillas a 4°C en la oscuridad

A. 10 Reacción de Griess

- 1.- Diluir la solución de 0.1M de nitrito a 1:1000 en medio RPMI para tener la solución a 100 μ M
- 2.- En una placa de 96 pozos establecer 3 columnas para las diluciones para la curva de referencia
- 3.- Colocar 50 μ l de medio RPMI en los pozos de las filas de B hasta H
- 4.- Agregar 100 μ l de la solución de nitritos 100 μ M a los 3 pozos de la fila A
- 5.- Realizar 6 diluciones seriadas (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13 and 1.56 μ M)
- 6.- No añadir solución a los últimos pozos (0 μ M)
- 7.- Agregar por triplicado cada una de las muestras experimentales (en este caso sobrenadante)
- 8.- Con la pipeta multicanal agregar 50 μ l de la solución de Sulfanilamida a todas las muestras experimentales y a todas las diluciones
- 9.- Incubar de 5-10 minutos a TA
- 10.- Con la pipeta multicanal agregar 50 μ l de la solución NED a todas las muestras experimentales y a todas las diluciones
- 11.- Incubar de 5-10 minutos protegido de la luz a TA
- 12.- Medir la absorbancia en lector de placas con el filtro de 520nm a 550nm

A. 11 Ensayo de la actividad de la arginasa

- 1.- Lisar 1x10⁶ células con 100 μ l de Tritón X-100 durante 10 minutos
- 2.- Centrifugar a 13,000g por 10 minutos
- 3.- Tomar 40 μ l del sobrenadante y colocar por triplicado en micro pozos de placa de 96 pozos
- 4.- Agregar 40 μ l de PBS en un pozo (blanco) y 40 μ l de agua en otro pozo

- 5.- Agregar 50µl del estándar de urea a un pozo
- 6.- Agregar 10µl del 5x buffer a cada pozo de muestra (no agregar a los blancos)
- 7.- Incubar durante 2 horas a 37°C protegido de la luz
- 8.- Se agrega 200µl del reactivo de urea a toso los pozos incluidos los blancos
- 9.- Incubar durante 60 minutos a TA
- 10.- Leer absorbancia en lector de placa a 430nm